
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES SUR LES SULFOBACTÉRIES

PAR M. S. WINOGRADSKY.

En 1887, j'ai publié ¹ les résultats de mes recherches physiologiques sur les organismes des eaux sulfureuses. Dans un autre travail, plus étendu ², j'ai montré depuis que ces êtres singuliers, assez nombreux pour que j'aie pu y distinguer 15 genres et plus de 25 espèces différentes, forment un groupe physiologique, très nettement caractérisé par le rôle que joue le soufre dans leur économie. Pour marquer cette ressemblance physiologique, qui va très loin, je leur ai donné le nom de *Schwefelbacterien* ou de *Sulfovactéries*.

L'impossibilité d'appliquer, à l'étude de ces organismes, les méthodes connues et éprouvées dans la science des organismes inférieurs rend leur étude difficile. Je n'ai réussi par aucun moyen à cultiver les *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Chromatium*, etc., à l'état pur dans des ballons renfermant un liquide nutritif, ce qui aurait été évidemment le meilleur moyen de se renseigner sur leurs besoins nutritifs. Ces organismes périssent aussi rapidement sur les milieux solides de culture, ce qui empêche de les isoler avec facilité.

1. Sur les sulfovactéries. *Bot. Zeitg*, 1887. V. ces *Annales*, t. I, p. 348.

2. Sur la morphologie et la physiologie des sulfovactéries. *Beitr. z. Morphol. und Physiol. d. Bacterien*, fasc. I, Leipzig, 1888.

La raison en est, comme je l'ai démontré, dans la singularité de la nutrition de ces êtres, qui les différencie de la plupart des espèces dépourvues de chlorophylle. Ils ne se développent bien que dans des eaux tenant en solution une quantité modérée, mais constante, d'hydrogène sulfuré ; l'accès de l'air doit pourtant être libre, puisque ce sont des organismes aérobies ; la teneur en matière organique du milieu doit être tout à fait minime, mais constante aussi. Toutes ces conditions ne sont complètement réalisables que si on renouvelle constamment le liquide approprié à la culture : c'est ce qui a lieu dans les sources sulfureuses. On s'explique ainsi la végétation si riche des sulfobactéries dans ces sources et leur développement difficile ailleurs.

Ces difficultés m'ont conduit à imaginer une méthode simple d'investigation physiologique en petit, avec des flocons de filaments gros comme une tête d'épingle et noyés dans une goutte d'eau. Cette méthode, d'une application restreinte dans les cas ordinaires, peut pourtant, dans quelques cas difficiles, mener au but par un chemin plus court et plus sûr que les cultures en grand. Il est toujours facile de trouver un flocon de *Beggiatoa* presque pur, ou de le purifier par des moyens mécaniques. Cet état de demi-pureté, qui serait mauvais pour une culture ordinaire, est suffisant pour une culture sous le microscope, à l'aide duquel on peut contrôler de jour en jour, presque d'heure en heure, la part de développement et d'action des germes étrangers. De plus, on peut, en faisant varier la constitution du liquide nutritif et en comparant l'elongation ou la multiplication des filaments du *Beggiatoa*, arriver à juger, presque aussi sûrement que dans une culture pure, des besoins nutritifs de l'espèce étudiée.

En imitant les conditions d'existence des sulfobactéries dans la nature, j'ai réussi à faire végéter dans une goutte d'eau, et cela pendant des semaines et des mois, des *Beggiatoa*, des *Thiothrix* et d'autres espèces. J'ai pu observer directement l'influence du milieu sur leur développement, et les phénomènes visibles de leur nutrition. Quant aux changements chimiques du milieu de culture, mis en évidence par des actions microchimiques, j'ai cru devoir les attribuer aux actions physiologiques des sulfobactéries, quand j'avais suivi de près l'évolution régulière de ces

êtres, et constaté leur caractère normal, ainsi que l'absence d'organismes étrangers.

La difficulté est précisément de démêler la vie physiologique de ces êtres des phénomènes morbides dont ils deviennent si facilement le siège, ou des actions intercurrentes. En voici une preuve des plus caractéristiques.

Tous les savants qui ont étudié ce sujet ont observé que si on introduit de la barégine dans des bouteilles remplies d'eau et bouchées, il s'y forme infailliblement de l'hydrogène sulfuré. On a naturellement attribué la production de ce gaz à l'activité vitale des organismes de la barégine. Cette interprétation est inexacte, le fait restant vrai. En soumettant, en effet, le contenu de ces bouteilles à une investigation microscopique systématiquement répétée, j'ai remarqué que dans ces conditions les filaments immersés périssent rapidement. Au bout de 3 à 5 jours, quand la production d'hydrogène sulfuré commence, on trouve déjà quantité de filaments morts, et quelques jours après, quand le liquide est saturé de H^2S , on n'en trouve plus de vivants. Les filaments gonflés, à demi désorganisés, que l'on découvre au microscope, sont alors privés des grains de soufre qu'ils contiennent toujours à l'état normal.

Je pouvais donc conclure que l'hydrogène sulfuré se formait aux dépens du soufre intracellulaire, mais il devenait très difficile d'attribuer cette conversion à l'activité vitale des sulfo-bactéries.

Ce doute se confirme pleinement, si on suit jour par jour la marche du phénomène au microscope. On transporte quelques flocons de Beggiatoa, très riches en grains de soufre, dans une goutte d'eau sur porte-objet, et on la recouvre d'une lamelle de 22-23^{mm}, de manière que les flocons restent au centre de la goutte qui s'écrase en les débordant de tous côtés. On tue alors les filaments en les lavant à l'eau distillée¹. En les observant ensuite de jour en jour pendant quelque temps, on voit, à mesure que les cellules mortes perdent leur soufre, une marge jaunâtre de grains et de cristaux de soufre se former le long des bords de la goutte, qui exhale une odeur très sen-

1. L'eau distillée tue rapidement les filaments de Beggiatoa. Ils deviennent de suite immobiles, perdent leur turgescence, se tordent, se cassent, se gonflent quelquefois, puis entrent en décomposition.

sible d'hydrogène sulfuré. La production de ce gaz dure tant qu'il reste du soufre au centre de la goutte. Enfin les filaments se désorganisent complètement et finissent par être méconnaisables.

La marche du phénomène est facile à comprendre. Le soufre se combine à l'hydrogène à l'abri de l'air, et l'hydrogène sulfuré, décomposé au contact de l'air, dépose aux bords de la goutte du soufre qui subit ainsi une migration du centre à la périphérie. Mais par quel mécanisme se produit la combinaison du soufre et de l'hydrogène? C'est une question qui, l'expérience précédente le montre, ne touche pas à la physiologie des sulfobactéries, puisqu'elles sont malades quand elle commence, et mortes quand elle a son maximum d'intensité. Il est probable qu'elle est due à l'action des organismes de la putréfaction, qui apparaissent bientôt dans la goutte et y pullulent autour des filaments morts. On sait qu'il se produit de l'hydrogène sulfuré dans la putréfaction de toutes les matières organiques contenant du soufre.

J'ai cru devoir insister sur cette expérience et sur son exacte interprétation, parce que nous y trouvons des enseignements dont nous aurons à profiter tout à l'heure, mais je reconnais qu'elle ne contredit en rien la possibilité d'une action réductrice de la part des sulfobactéries dans d'autres conditions plus favorables. La faculté de réduire les sulfates, avec production d'hydrogène sulfuré, leur a été attribuée par Lothar Meyer¹, Cohn², Plauchud³, Etard et Olivier⁴. Les granulations de soufre, dont se garnissent les bactéries dans les eaux sulfureuses, constituent même, suivant MM. Etard et Olivier, un témoin des phénomènes de réduction s'accomplissant dans le protoplasma de l'être vivant.

L'expérience m'a, au contraire, amené à cette conclusion, exprimée un peu avant moi par M. Hoppe-Seyler⁵, que les sulfobactéries ne sont pour rien dans la réduction des sulfates en présence des matières organiques, et que la formation d'hydro-

1. *Journal f. prakt. Chemie*, t. XCI, § 864.

2. *Beiträge z. Biologie d. Pflanzen*, t. I, fasc. 3, 1873.

3. *Comptes rendus*, 1878.

4. *Comptes rendus*, 1882.

5. *Zeitschr. f. phys. Chemie*, t. X, fasc. 5, 1886.

gène sulfuré résulte d'un phénomène secondaire, d'une fermentation à l'abri de l'air.

Il est tout d'abord bien facile de se convaincre que la formation des granules de soufre, dans les cellules de sulfobactéries, est due, non à la réduction des sulfates, mais à l'oxydation de l'hydrogène sulfuré de l'eau. Des filaments de *Beggiatoa*, immergés dans une solution de sulfates et en culture suffisamment pure, perdent rapidement leurs granules de soufre et n'en forment plus, si longtemps qu'on les y laisse. Mais aussitôt qu'on leur donne un peu d'eau contenant de l'hydrogène sulfuré, fût-ce même la solution de sulfate dans laquelle ils vivent, et dans laquelle on a fait barboter quelques bulles de ce gaz, on voit de nouvelles granulations apparaître au bout de 2 à 3 minutes, et remplir les cellules au bout de quelques heures. Il n'y a donc aucun doute à avoir sur l'origine du soufre dans les sulfobactéries.

Quel est le rôle physiologique de ce soufre si avidement et si abondamment emmagasiné par le protoplasma des cellules vivantes? C'est une question que j'ai longuement étudiée. Je suis arrivé à ce résultat qui a été tout récemment contesté par M. Olivier¹, c'est que ce soufre est transformé en acide sulfurique par la plante. La démonstration de ce fait, par le procédé que j'ai suivi, est à la fois si simple et si sûre, que je ne puis deviner ce qu'on peut lui reprocher, ni comment, si M. Olivier l'a essayée, il peut en contester les résultats.

J'ai commencé par étudier les réactions microchimiques qui peuvent servir à déceler la présence de l'acide sulfurique, et je me suis arrêté à l'emploi d'une solution de chlorure de baryum, acidulée avec de l'acide chlorhydrique. Quand le liquide contient un sel de chaux, il est tout aussi commode de l'évaporer tout simplement, et d'observer au microscope la formation des cristaux si caractéristiques de sulfate de chaux. Mais j'ai préféré la réaction du sulfate de baryte.

L'emploi de l'eau distillée est toujours à rejeter avec les *Beggiatoa*, qui meurent dans ce liquide. On peut heureusement la remplacer par une eau de source très pauvre en sulfate. Celle dont je me suis servi ne renfermait que 0,0014 % d'acide

1. *Comptes rendus*, 48 et 23 juin 1838.

sulfurique. Cette teneur est inférieure à celle qui permet la formation, sous l'influence d'une goutte de liquide barytique, de cristaux de sulfate de baryte reconnaissables au microscope. Il faut aller, pour cela, au moins à 0,004 % d'acide sulfurique. La réaction microchimique est donc moins sensible dans ce cas que la réaction macroscopique, mais j'y trouvais l'avantage de n'obtenir la réaction de l'acide sulfurique, sous le microscope, qu'après un enrichissement considérable du liquide initial en acide, et de la rendre ainsi indépendante de la dose de sulfate de chaux existant à l'origine dans l'eau dont je me servais.

On prend alors quelques flocons de filaments, aussi semblables que possible, riches en soufre. On les lave dans une cuvette, remplie d'eau de source fréquemment renouvelée, et on les transporte ensuite dans une série de gouttes, de grandeurs égales, disposées sur des porte-objets. On les divise en deux lots en laissant dans le second les gouttes les plus riches en filaments. Ce lot servira de témoin. On y tue les filaments en les chauffant légèrement ou en les laissant dans une atmosphère saturée de chloroforme. Les filaments du premier lot restent vivants, et leur état est soigneusement contrôlé au microscope pendant toute l'expérience.

En soumettant après 24, 48 heures, etc., les gouttes de chaque lot à la même épreuve, par le liquide barytique, je fus frappé par la précision des résultats : quantité de cristaux de sulfate de baryte ou de sulfate de chaux dans les gouttes de *Beggiatoa* vivantes ; aucune réaction dans les gouttes témoins, qui pourtant étaient plus riches en matériaux renfermant du soufre. En comparant au microscope la quantité de cristaux de sulfate de baryte, avec celles que me donnaient au même moment des solutions titrées d'un sulfate, j'ai pu me faire une idée approximative de la rapidité du phénomène d'oxydation dans les cellules vivantes.

J'ai trouvé dans une expérience les chiffres suivants. La teneur en acide sulfurique d'une goutte de 2 à 3 dixièmes de centimètre cube, d'eau de source à 0,0014 % d'acide sulfurique et contenant un flocon minime de *Beggiatoa*, a atteint :

Après 24 heures	0,0066 p. 100.
— 48 —	0,0093 —
— 5 jours	0,0448 —
— 8 —	0,0486 —

La quantité d'acide sulfurique dans le liquide baignant les filaments vivants était donc devenue plus de 34 fois plus grande qu'à l'origine, tandis que, dans les gouttes témoins, elle était restée inférieure jusqu'à la fin, dans cette expérience, à la limite de sensibilité de la réaction microchimique, c'est-à-dire que la quantité d'acide, formée par oxydation purement chimique du soufre des cellules mortes, n'avait augmenté, au maximum, que de 0,0014 %, à 0,004 %, ou de trois fois sa valeur primitive.

Ainsi le rôle physiologique des sulfobactéries est purement oxydant. L'hydrogène sulfuré du milieu ambiant est oxydé dans leur protoplasma, et il s'y dépose du soufre, qui est à son tour transformé en acide sulfurique et excrété. Le protoplasma de l'être vivant intervient activement dans ce phénomène de combustion, et le rend particulièrement intense. L'énergie devenue disponible dans cette combustion est, comme je l'ai démontré par des expériences spéciales, la source principale, ou même, comme je le crois, unique de leur vie.

Les lecteurs des *Annales* connaissent déjà quelques-uns de ces résultats; mais j'ai cru devoir insister sur mes méthodes, parce qu'elles me fournissent non seulement le moyen de réfuter les objections de M. Olivier, mais d'attaquer ses conclusions.

M. Olivier ne s'occupe pour cette fois que du rôle physiologique du soufre déjà déposé en réserve dans les cellules des «organismes à soufre de la barégine et de la glairine», ce qui est la même chose que ce que j'appelle beaucoup plus brièvement les *sulfobactéries*. Son mode opératoire ne diffère pas de celui que j'avais critiqué dans mon travail et rejeté comme trop peu sûr. Il introduit dans des ballons de la barégine ou de la glairine fraîche, lavée à l'eau distillée, et l'y abandonne immergée dans ce même liquide, pendant un temps assez long.

La matière sur laquelle il opérait ainsi était-elle pure, formée d'une espèce unique ou d'espèces à fonctions physiologiques semblables? J'ai analysé maintes fois au microscope, près des sources mêmes, les végétations blanches des eaux sulfureuses: je les ai toujours trouvées formées d'espèces des genres *Beggiatoa* et *Thiothrix*, qui y sont dans un état plus pur qu'ailleurs; mais leurs masses visqueuses sont pénétrées d'impuretés de toute sorte, dont il est impossible de les débarrasser mécani-

quement. On y trouve des bactéries diverses, des oscillaires vertes, beaucoup d'infusoires, de vers, des *Beggiatoa* mortes, des débris végétaux, des cristaux de soufre, des grumeaux limoneux riches en sulfure de fer, etc., etc.

Les produits formés par la fermentation de cette masse hétérogène sont considérés par M. Olivier comme dus exclusivement à l'action physiologique des organismes à soufre. Il observe la formation d'acide carbonique, d'hydrogène sulfuré, de sulfocyanhydrate d'ammoniaque. La découverte de ce dernier corps dans les produits de désassimilation lui semble un fait absolument nouveau, qui assigne au soufre intra-cellulaire une fonction dont on ne connaissait jusqu'alors aucun exemple en physiologie, celle de remplacer l'oxygène dans la transformation des albuminoïdes en amides, et, d'une façon générale, dans la combustion de la matière vivante.

Cette théorie me semble très peu fondée, et l'interprétation des phénomènes observés par M. Olivier très différente de celle qu'il propose. Nous savons déjà que les organismes très délicats sur lesquels il opère périssent facilement quand on les met dans de mauvaises conditions d'existence. M. Olivier leur impose le manque d'air et le contact de l'eau distillée. Il ne dit pas s'il a contrôlé les cultures au microscope, et si les organismes dont il voulait étudier les fonctions physiologiques avaient un air normal, si les *Beggiatoa* étaient bien mobiles, etc. Je ne crois pas me tromper en admettant le contraire. La putréfaction ne tarde pas à s'emparer de cette masse de sulfobactéries mortes et de débris divers. Rien d'étonnant à ce qu'il se forme alors de l'acide carbonique et de l'hydrogène sulfuré : c'est toujours le cas avec des matières organiques contenant du soufre. Quant à la formation du sulfocyanhydrate d'ammoniaque, il m'est difficile de lui attribuer la signification ou l'importance que lui donne M. Olivier.

A propos de la signification, je dois faire remarquer que la présence de l'acide sulfocyanohydrique dans les produits de désassimilation cellulaire est un fait depuis longtemps connu en physiologie. M. Raulin¹ l'a trouvé dans les cultures d'*Aspergillus niger*, M. Munk², dans l'urine de l'homme à la dose de 0^{gr}.08

1. *Annales des sc. naturelles*, 1870.

2. *Arch. f. path. Anat.*, t. LXIX, p. 354.

par litre. Une analyse de M. Gschleiden¹ n'en a donné que 0^{gr}.0225 par litre. Depuis, on l'a retrouvé dans l'urine de beaucoup d'animaux. Or on admet assez généralement aujourd'hui que les phénomènes de désassimilation cellulaire donnent naissance partout aux mêmes produits. Néanmoins, il serait intéressant de chercher cet acide² dans les produits de putréfaction d'une matière contenant du soufre.

Relativement à l'importance, je remarque que rien, dans le travail de M. Olivier, ne témoigne que ce corps se forme autrement qu'en proportions très faibles, toujours faciles à déceler, à cause de la sensibilité des réactifs de l'acide sulfocyanhydrique, mais que rien n'autorise à mettre en rapport d'équivalence avec la quantité de soufre disparue des cellules qui l'ont produit.

M. Olivier consacre enfin une longue série d'expériences à démontrer que la formation de l'hydrogène sulfuré dans les ballons où il enferme de la barégine avec de l'eau distillée et désaérée ne s'explique pas par une oxydation du soufre intra-cellulaire, suivie de la réduction du sulfate ainsi formé, mais par une transformation directe de ce métalloïde en hydrogène sulfuré. Là-dessus, M. Olivier a raison. Rien d'autre ne pouvait se produire dans des flacons d'où on a éliminé l'air qu'on a remplacé par de l'hydrogène. Nous savons déjà que l'hydrogène sulfuré peut provenir tout aussi bien de l'hydrogénéation du soufre que de la réduction des sulfates³. S'il n'y avait pas trace de sulfates dans le liquide, c'est à la première cause qu'il fallait attribuer la formation d'hydrogène sulfuré. Mais cette conclusion très exacte n'a rien à faire avec mes idées et mes conclusions sur le rôle physiologique du soufre dans les sulfobactéries, car il ne s'agit

1. *Arch. f. gesamm. Physiol.*, t. XIV, p. 401, et t. XV, p. 350.

2. M. Olivier combine l'acide sulfocyanhydrique à l'ammoniaque pour avoir dans les produits des organismes à soufre « un dérivé sulfosubstitué d'un isomère de l'urée ». L'ammoniaque ne manque certainement pas dans les produits de putréfaction dans le liquide, mais M. Olivier n'a dosé, dans l'extrait alcoolique, ni l'acide sulfocyanhydrique, ni l'ammoniaque, ni les autres bases. Il ne peut par conséquent savoir si l'acide est libre ou combiné à d'autres alcalis.

3. On trouvera des exemples bien étudiés de ces deux cas possibles dans les ouvrages suivants :

MIQUEL, Fermentation sulfhydrique. *Bull. de la Soc. chimique*, t. XXXII, 1879.

HOPPE-SSEYLER, Fermentation de la cellulose. *Zeitschr. f. phys. Chemie*, t. X, p. 437.

pas ici de vie physiologique, mais d'un phénomène de fermentation ou de putréfaction des sulfobactéries.

J'insisterai un peu plus sur les expériences de culture sous le microscope faites par M. Olivier. Ce savant a examiné jour par jour des filaments de *Beggiatoa*, et les a vus perdre leur soufre avec la même rapidité, qu'ils fussent exposés ou non aux vapeurs de chloroforme, ou bien immersés dans de l'eau phéniquée à 4 % ou dans de la glycérine. La même chose a lieu quand les chambres humides de culture, en présence du chloroforme, sont continuellement traversées par un courant d'hydrogène.

De cette absence d'action des antiseptiques et des anesthésiques, il faudrait évidemment conclure que la vie cellulaire n'est pour rien dans la consommation du soufre, qui disparaît sans être oxydé. Mais je n'ai jamais rien observé de pareil avec des filaments sains de *Beggiatoa*, et j'ai toujours trouvé que l'acide sulfurique augmentait à mesure que les cellules perdaient leurs granulations. Le chloroforme entrave, il est vrai, la marche du phénomène, mais n'oublions pas que les grains de soufre peuvent disparaître, comme nous l'avons vu plus haut, des cellules mortes, quoique bien plus lentement que des cellules vivantes. Les causes de ce phénomène sont diverses.

1^o Si les filaments sont conservés à l'abri de l'air, on voit le soufre disparaître, converti en H₂S par l'action des organismes de putréfaction, qui apparaissent dans le liquide.

2^o On voit quelquefois les granulations disparaître, sans qu'il y ait possibilité d'oxydation ou multiplication notable d'organismes étrangers. Cette disparition est, en général, très lente, et il n'y a pas un grand intérêt à chercher la cause d'un phénomène qui n'est plus physiologique. On peut pourtant se rappeler que le soufre, surtout finement divisé comme il l'est dans les granulations, est facilement soluble dans beaucoup de réactifs. Dans les cellules vivantes, il est protégé par le protoplasma, dont la difficile perméabilité a souvent été constatée; mais dans les cellules mortes et à demi désorganisées, les grains de soufre sont plus facilement attaquables, par exemple, par les sulfures alcalins et terreux, qui ne manquent pas dans les liquides contenant de l'hydrogène sulfuré, ou bien par d'autres dissolvants¹.

1. Le soufre est, comme on sait, soluble dans le chloroforme et dans l'éther.

3^e J'ai observé encore un phénomène tout différent, qui fait reparaître par une voie purement physique le soufre des cellules mortes. Les granulations sombres des sulfobactéries ne sont pas, je l'ai démontré, du soufre cristallin, ni même solide, mais des gouttelettes d'une consistance huileuse ou molle. Dans les cellules vivantes, la cristallisation n'a jamais lieu, mais si on tue des cellules très riches en soufre, elle commence quelquefois immédiatement. Les gouttelettes se réduisent en masses plus grandes, se transforment en cristaux qui quittent les cellules d'une manière ou de l'autre. De longs morceaux de filaments se dégarnissent presque simultanément de leur soufre qu'on retrouve sous forme de cristaux adhérents aux filaments ou dispersés dans le liquide ambiant. Quand M. Olivier a vu, dans ses préparations montées à la glycérine, les « granulations des filaments diminuer de volume et de nombre en même temps que de petits cristaux octaédriques apparaissaient dans le liquide ambiant », c'est sans doute de ce phénomène qu'il s'agissait.

Il est difficile de préciser, dans chaque cas, les vraies causes des faits observés par M. Olivier, mais il est clair que ce savant ne tenait pas un compte suffisant, dans son procédé ou dans son argumentation, de la multiplicité ou de la complexité des phénomènes, ainsi que de la nature particulière des organismes en question.

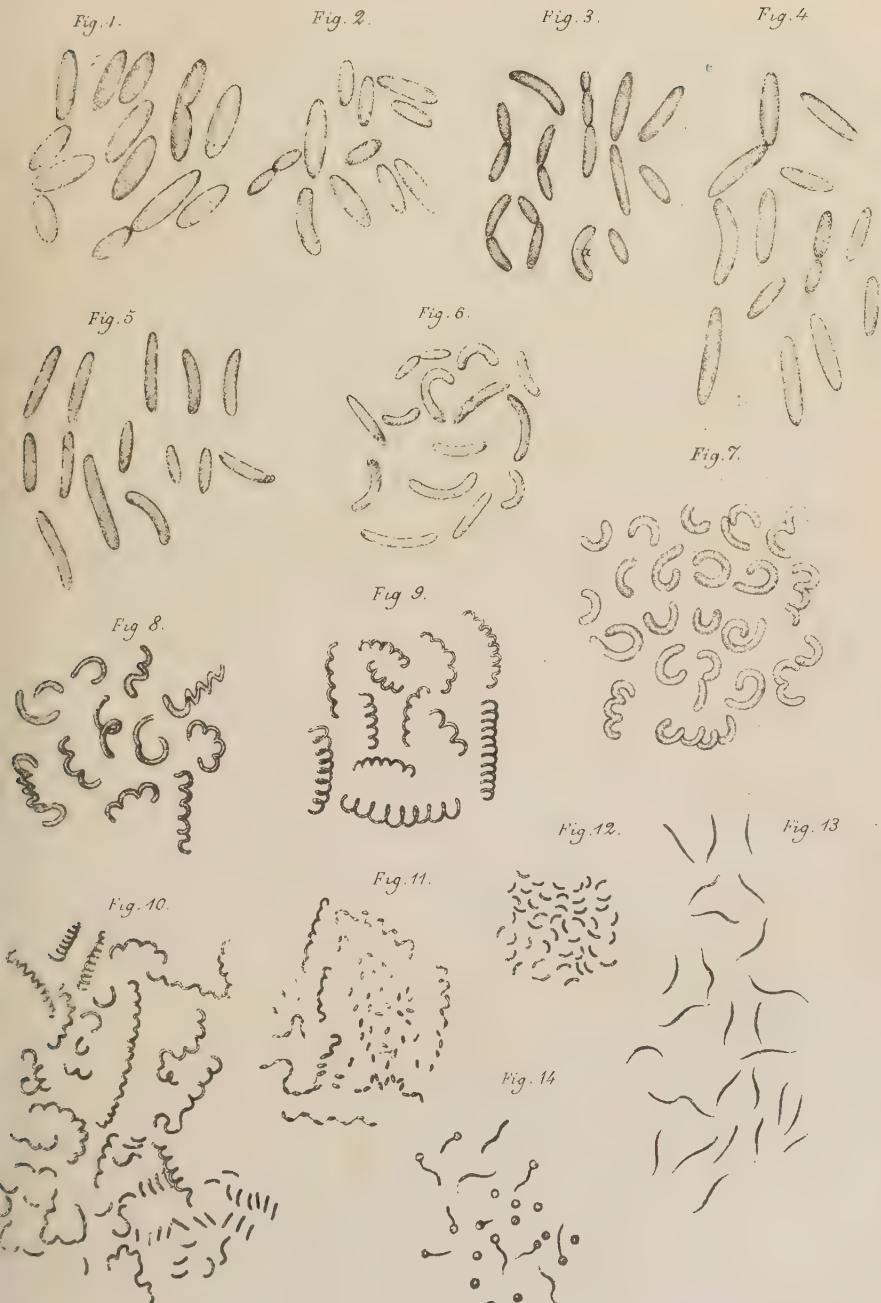
C'est que leur culture n'est vraiment pas une tâche facile, et exige beaucoup d'expérience. Au début de mes études sur ce sujet, j'ai perdu bien du temps en tâtonnements infructueux, et j'ai, à un moment, considéré comme un grand progrès de maintenir pendant plus de vingt-quatre heures mes *Beggiatoa* vivants et en bon état dans une culture sur porte-objet. M. de Bary me disait alors qu'il n'avait jamais pu dépasser quelques heures. C'est seulement quand j'ai étudié les manifestations vi-

M. Olivier ne mêlait certainement pas ces deux liquides aux gouttes chargées de filaments sur lesquels il voulait étudier leur action, mais il ne pouvait empêcher les vapeurs de ces réactifs de se condenser dans ces gouttes. Le soufre est également soluble dans le phénol et dans la glycérine. Il l'est, il est vrai, très peu, mais c'est le soufre cristallin qu'on a en vue en parlant, dans les traités de chimie, de la solubilité de ce métalloïde. Les granulations des sulfobactéries sont, en général, beaucoup plus facilement solubles. On n'a, pour s'en convaincre, qu'à comparer l'action lente de l'alcool sur le soufre cristallin, et la rapidité avec laquelle il fait disparaître les granulations intracellulaires.

tales de ces organismes, et trouvé leurs conditions particulières de culture, que j'ai abouti. M. Olivier n'a pas recherché ces conditions, ou, du moins, il ne dit rien de ses efforts. Il s'est encore moins servi des instructions minutieuses données dans mon travail. En traitant les sulfobactéries par l'eau distillée, le phénol, la glycérine, etc., il les croyait capables de supporter ce traitement au moins aussi bien que le supportent d'autres bactériens. Mais il se trompait. Leur force de résistance, vis-à-vis des antiseptiques, n'est pas supérieure à celle de quelques algues vertes délicates, d'une *spirogyra*, par exemple.

Comme M. Olivier n'a pas réussi à cultiver ces organismes microscopiques, il n'a pu étudier leur évolution, ni séparer, par suite, les phénomènes normaux des phénomènes morbides, ni distinguer même un individu vivant d'un individu mort, car quand la mort n'amène pas de changements morphologiques, c'est le développement seul qui, au microscope, est un signe de la vie. Je crois donc pouvoir dire que ses conclusions ne touchent en rien à la physiologie de ces êtres, et n'ébranlent nullement les miennes.

Zurich, 8 janvier 1889.



CONTRIBUTIONS A L'ÉTUDE DU PLÉOMORPHISME DES BACTÉRIENS,

PAR M. EL. METCHNIKOFF.

De toutes les questions concernant la morphologie des microbes, celle du pléomorphisme des bactériens occupe incontestablement un des premiers rangs. On sait que dès le début des études approfondies sur la morphologie de ces organismes, les savants se sont divisés en deux groupes. Les uns, avec M. *Cohn* en tête, admettaient pour les bactéries un cycle de développement fort restreint, et envisageaient les représentants de ce groupe comme des organismes constants de forme; pour les savants de cette école, les genres (*Micrococcus*, *Bacterium*, *Bacillus*, etc.) acceptés par M. *Cohn* représentaient des groupes naturels et bien délimités, de sorte qu'un *Bacillus* ne pouvait jamais se transformer en *Micrococcus* ou en *Spirillum*, et réciproquement. Les autres savants, avec M. *Nægeli* pour chef, admettaient au contraire un polymorphisme des bactériens presque illimité : les microcoques, bacilles et spirilles pouvaient, d'après eux, se transformer les uns dans les autres, et n'étaient autre chose que les stades d'évolution d'un organisme pléomorphe au plus haut degré.

Pendant que la plupart des pathologistes se déclaraient favorables à l'opinion de M. *Cohn*, plusieurs botanistes distingués se prononcèrent pour la théorie du pléomorphisme. Parmi ces derniers je dois d'abord mentionner le professeur *Cienkowsky*, qui aborda la question d'une manière générale. Après avoir constaté que certaines algues vertes (*Stigeoclonium* et autres) manifestaient une transformation de leur état filiforme en un amas irrégulier de cellules, réunies par une substance glutineuse et considérées comme appartenant au groupe des Palmellacées, *Cienkowsky* se demanda, si parmi les algues incolores, ou bactériens, il ne trouverait pas des transformations analogues. Des recherches entreprises pour répondre à cette question,

*Cienkowsky*¹ conclut que les bactéries filiformes, comme les *Lepthothrix* ou *Cladotrichia*, pouvaient donner naissance à des *Zoogloea*, composées de cellules rondes, ovales ou bacilliformes, réunies en amas par une substance glutineuse. Plus tard, ces résultats furent confirmés et beaucoup élargis par M. *Zopf*², qui est devenu parmi les botanistes le principal champion de la théorie du pléomorphisme des bactéries. Il l'appliqua entre autres aux spirilles, qu'il considérait comme des conidies détachées des filaments de *Cladotrichia*.

Les pathologistes, versés dans l'étude des bactéries, s'élevaient vivement contre les théories pléomorphistes des algologues³, et ce n'est qu'après des recherches longtemps suivies qu'ils acceptèrent ces théories dans un sens plus ou moins limité. Ce fut d'abord M. *Huppe* qui chercha à concilier les contradictions dans son Traité sur les formes des bactéries⁴.

Le pléomorphisme fut ainsi accepté par un nombre considérable de savants, et tout récemment encore M. *Koch*⁵ fit des concessions en sa faveur. Mais il a subi dernièrement une attaque sensible de la part de M. *Winogradsky*⁶, qui dans un travail remarquable sur les bactéries sulfureuses démontre l'inexactitude des résultats obtenus par M. *Zopf*, et chercha à prouver « que jusqu'à présent il n'a été trouvé aucun cas de pléomorphisme chez les bactéries » (p. 114).

Considérant que, dans l'état actuel de nos connaissances, il serait utile de recueillir le plus grand nombre de faits capables d'éclaircir la question du pléomorphisme des bactéries en général, je me propose d'exposer ici mes observations sur un parasite des Daphnies, que j'introduis dans la science sous le nom de *Spirobacillus Cienkowskii*, en mémoire de feu le professeur *Cienkowsky*, l'un des champions de la théorie du pléomorphisme.

Des l'automne de 1885 je remarquais dans les étangs d'O-

1. Mémoires de l'Acad. des Sciences de Saint-Pétersbourg, 1877. Cet intéressant article est peu connu parmi les bactériologistes, comme on peut en juger d'après le fait que M. *Loeffler* ne le cite point dans son Aperçu historique de bactériologie.

2. *Zur Morphologie der Spaltpflanzen*, 1882, et *Die Spalipilze*, 1885.

3. Voy. surtout *Flügge* dans *Deutsche medicinische Wochenschrift*, 1885.

4. *Die Formen der Bacterien*, 1886.

5. *Die Bekämpfung der Infektionskrankheiten*, 1888.

6. *Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Bacterien*, Heft I; *Zur Morphologie und Physiologie der Schwefelbacterien*, 1888.

dessa, peuplés par des millions de *Daphnia magna*, une certaine quantité de ces cladocères qui se distinguaient par leur couleur rouge écarlate. L'observation microscopique de ces exemplaires anomaux m'a démontré aussitôt que la coloration rouge était due au parasitisme d'une bactérie, qui se présentait sous des aspects différents suivant les stades de la maladie de son hôte. Cette coloration intense ne se manifestait pas du reste d'un seul coup, mais apparaissait graduellement. Au début, on ne pouvait apercevoir qu'une accentuation très légère de la coloration jaune clair naturelle à la *Daphnia magna*. Peu à peu cette coloration devenait jaune grisâtre, pour passer au rose faible et prendre ensuite une teinte rouge écarlate de plus en plus prononcée. Toutes ces transformations pouvaient être facilement suivies sur une seule et même Daphnie, qui sous d'autres rapports paraissait bien portante, nageait et prenait sa nourriture comme d'habitude. Parvenu au stade rouge foncé, l'animal continuait encore pendant un ou deux jours cette vie quasi normale; mais au bout de ce terme, les signes de faiblesse se manifestant subitement, la Daphnie mourait couchée sur le côté. La durée de la maladie, dès le premier changement de coloration jusqu'à la fin, était de quatre à cinq jours. Après la mort, la coloration écarlate persistait encore quelque temps, puis elle commençait à perdre son intensité et se changeait en gris rougeâtre plus ou moins pâle.

Tous les changements de coloration, survenus pendant la maladie, correspondaient régulièrement aux différents états de développement du parasite. Au début, chez les Daphnies conservant leur aspect normal presque intact, la cavité du corps contenait des microbes peu nombreux, en forme de cellules ovoïdes plus ou moins allongées (longs de 3 à 5 μ) et ressemblant plutôt à quelques espèces de levures (fig. 4). Cette impression augmentait encore par l'aspect des cellules, réunies par deux, de façon que l'une d'elles paraissait beaucoup plus grande que l'autre. L'observation poursuivie démontrait cependant qu'il ne s'agissait ici nullement d'un bourgeonnement, mais bien d'une division en deux segments inégaux, cas assez fréquent chez les bactéries. A côté de ce mode de scissiparité on pouvait facilement reconnaître la division régulière en deux cellules égales, ce qui constituait la règle aussi pour notre parasite. Si on ne connaissait de ce dernier que cet état de cellules ovales

se multipliant par division transversale, et si on voulait classer notre organisme, il faudrait absolument le ranger parmi les représentants de l'ancien genre *Bactérium* de M. Cohn.

Parvenu dans la cavité générale de la Daphnie, le parasite se multiplie d'une manière très intense, ce que prouvent l'augmentation rapide du nombre des bactéries ainsi que la diminution progressive de leur taille, accompagnée par un changement graduel de forme. Les cellules ovoïdes, après plusieurs divisions répétées, deviennent plus minces qu'au début, rappelant de plus en plus la forme caractéristique des bacilles à bouts arrondis. Ces changements s'opèrent du reste si graduellement qu'il est absolument impossible d'établir une limite quelconque entre la forme du *Bactérium* et celle du bacille (fig. 2-5). Pour la plupart, ces bactéries conservent leur aspect de bacilles droits ; mais dès les premiers stades de la maladie on aperçoit déjà un petit nombre d'individus quelque peu recourbés en arc (fig. 2, 3, a). A mesure que les parasites se multiplient dans le sang de la Daphnie, la quantité de ces bacilles courbes augmente sensiblement et en même temps la courbure de ces derniers devient de plus en plus prononcée (fig. 6). Peu à peu tous les bacilles se recourbent ainsi, et nous obtenons un nouveau stade de notre bactérie, qui se compose d'individus isolés ou réunis en petits groupes de deux, trois individus et plus (fig. 7). Ce regroupement, résultant d'une division transversale, conduit à la formation de véritables spirilles qui se présentent d'abord assez épais et comparativement courts (longs de 5 à 8 μ). Mais, comme la prolifération continue avec une activité très grande, les spirilles deviennent de plus en plus longs et minces. Ces transformations peuvent être suivies dans tous leurs détails, d'autant plus qu'il ne manque pas de formes intermédiaires, chez lesquelles un ou deux articles terminaux conservent leurs caractères primitifs, tandis que les autres présentent déjà les modifications mentionnées (fig. 8). Après cet état intermédiaire, tous les parasites, contenus dans la même Daphnie, se transforment en spirilles très minces, en boucles, et ressemblent le plus au *S. volutans* d'Ehrenberg¹.

En les observant à l'état vivant, ils se présentent sous forme de corps cylindriques souvent très mobiles, dont la partie

1. *Die Infusionsthierchen*, 1838.

centrale apparaît plus transparente que la périphérie, et ce n'est qu'après une étude à de forts grossissements des préparations colorées par les couleurs d'aniline qu'on peut se faire une idée juste de la composition de la spirale (fig. 9). Les spires des spirillums bien développés sont toujours très resserrées l'une contre l'autre, ce qui rend la forme générale semblable à un cylindre vide. Mais au bout d'un certain temps la distance entre les articles qui composent le spirillum augmente, la spirale se redresse plus ou moins, et nous obtenons des filaments allongés, rappelant les formes spirilliennes de beaucoup de bactéries (fig. 10). Cet état est du reste de courte durée, car les filaments se divisent en fragments plus ou moins courts ; il s'opère peu à peu une dissociation complète des spirales en leurs éléments, formés d'articles recourbés qui rappellent les bacilles courbes, mentionnés plus haut, avec cette différence pourtant, que ces derniers étaient beaucoup plus grands de taille. On peut en juger en comparant les figures 7 et 12 qui représentent les deux formes recourbées de notre bactérie sous le même grossissement (2,020 fois). Quelquefois cette dissolution des spirilles fait encore un pas de plus, parce que les articles isolés provenant des spirales présentent non la forme de bacilles recourbés, mais de corps ovales infiniment petits, rappelant presque des coccus un peu allongés (fig. 11). Dans la période finale de la maladie, nous retrouvons toute la cavité du corps des Daphnies infectées presque entièrement remplie par de petites bactéries très recourbées, très mobiles pendant leur vie. Cet état n'est pas le dernier observé chez le crustacé mentionné, car il est encore suivi par une forme de filaments extrêmement minces, plus épais au milieu et effilés aux extrémités (fig. 13). Ce stade, qui résulte d'un allongement considérable de la petite bactérie recourbée, ne se trouve du reste qu'après la mort de la Daphnie.

Comme il m'était possible de suivre le développement successif de la bactérie parallèlement à la marche progressive de la maladie, j'ai surtout tâché de retrouver chez la première un état de sporulation, qui la rendrait capable de résister après la mise en liberté des parasites, lors de la décomposition des Daphnies mortes. En observant les bacilles droits des premiers stades sur des préparations colorées, j'ai rencontré assez souvent des exemplaires munis d'un certain nombre d'espaces incolores intercalés

entre les segments fortement colorés ; mais on ne pouvait douter qu'il ne s'agissait ici nullement de spores, mais simplement de granulations incolores qui se retrouvent fréquemment chez les différentes bactéries. Je suis beaucoup plus tenté de considérer comme des spores des petits corpuscules brillants et régulièrement sphériques qui se forment à l'une des extrémités des filaments minces, remplissant la cavité du corps des Daphnies mortes (fig. 14). Quoique je doute fort peu de la nature sporifère de ces petites sphères, il m'a été néanmoins impossible de la prouver d'une manière incontestable en constatant leur germination. Je dois noter que, malgré des efforts multipliés, je ne suis parvenu ni à faire pousser le spirobacille dans un milieu nutritif quelconque, ni à observer son passage naturel dans le corps de la Daphnie avec la nourriture ou par un autre procédé. En essayant de cultiver le stade de spirillum dans la gélatine légèrement acidulée, j'ai pu observer un allongement sensible des boucles, mais qui n'a été suivi d'aucun développement plus ou moins actif. J'ai conservé aussi, bien souvent, des Daphnies bien transparentes dans de l'eau qui contenait des milliers de spores, mais ici encore, il m'a été impossible de suivre la marche de l'infection. Le premier stade que je pouvais découvrir était déjà composé par des bactériaux ovales et gros, comme ceux que j'ai décrits plus haut. Il reste donc une lacune sensible dans l'histoire du développement de notre bactérie, ainsi que dans celle de la maladie provoquée par elle.

Comme je l'ai déjà mentionné, les transformations du *Spirobacillus Cienkowskii* marchent parallèlement à l'évolution de la maladie, caractérisée par la coloration plus ou moins prononcée des Daphnies. Dans les Daphnies colorées en jaune ou en jaune grisâtre, je ne trouvais que les états bacillaires ; l'apparition d'une teinte rougeâtre correspondait à la transformation en spirilles ; les Daphnies franchement rouges contenaient déjà pour la plupart des spirillums en voie de décomposition ou bien des bactéries recourbées et minces. Ce n'est que rarement que la mort de l'hôte survenait au stade du spirillum intact ; ordinairement elle arrivait plus tard, lors de la décomposition des spirales en articles isolés.

On ne peut douter que la coloration des Daphnies atteintes ne soit provoquée par un pigment rouge produit par la bactérie

même et colorant le milieu dans lequel elle pullule. Tant que le nombre des parasites (dans les premiers stades de la maladie) est peu considérable, la quantité de pigment est insuffisante pour donner une coloration prononcée de l'animal entier; mais dès que la multiplication des bactéries atteint son degré maximum, la Daphnie se colore en rouge plus ou moins foncé.

Le parallélisme entre la succession des formes du parasite et la marche progressive de la maladie, ainsi que l'existence abondante de tous les états transitoires entre les différentes formes sous lesquelles apparaît notre *Spirobacillus*, suffisent déjà pour enlever le moindre doute sur la réalité du pléomorphisme décrit dans cet article. Mais il existe encore un moyen de vérifier l'exactitude des faits annoncés. Ne me contentant pas d'observations répétées sur une même Daphnie malade à travers ses parois transparentes, je faisais à plusieurs reprises de petites saignées à une même Daphnie, et j'arrivais à obtenir ainsi des préparations colorées qui donnaient de beaucoup meilleurs résultats que des observations superficielles sur le vivant. J'ai pu constater ainsi que les bacilles pour la plupart droits, représentés sur la figure 3, étaient transformés au bout de dix-neuf heures en bactéries recourbées et en partie même en spirilles épais, de la figure 7. Les piqûres légères faites pour se procurer une goutte de sang n'occasionnent pas la mort de l'animal, mais guérissent facilement, comme je l'ai indiqué dans mon mémoire sur une maladie des Daphnies, provoquée par une espèce de levures¹.

Dans le *Spirobacillus Cienkowskii* nous voyons donc la succession régulière des états suivants : 1^o bactériums ovales; 2^o bacilles droits; 3^o grands bacilles courbes; 4^o spirillum; 5^o petits bacilles courbes; 6^o filaments minces; 7^o spores. On voit bien qu'il s'agit ici d'un véritable pléomorphisme, dont la signification ne peut être contestée. Sion était tenté, en présence de ce fait que dans l'évolution du *Spirobacillus Cienkowskii* il ne se rencontre pas de stade de coccus véritable, de se rallier à la conclusion de M. *Winogradsky*, qu'on ne connaît point de bactéries allongées se transformant en coccus capables de division, on pourrait facilement prouver l'inexactitude d'une pareille supposition. Il existe toute une série de bactéries, qu'on peut désigner avec M. *Biedert* sous le nom de *Coccobacillus*, dans le dévelop-

1. *Archives de Virchow*, V, 96, p. 492.

pement desquelles un stade de filament ou de bacille à pointes arrondies est suivi par un état de coccus véritables, se divisant en deux à la façon ordinaire. Le microbe du choléra des poules, le *Coccobacillus prodigiosus*¹ (le *Micrococcus prodigiosus* des auteurs), la bactéries de la maladie des furets, décrite dernièrement par MM. Eberth et Schimmelbusch², et bien d'autres espèces encore nous présentent des exemples parfaitement établis de pléomorphisme avec un stade de coccus.

EXPLICATION DES FIGURES (Pl. I).

Toutes les figures ont été faites à la chambre claire de Nachet et avec un grossissement de 2,020 fois (Oc. 5 et obj. 1/18 de Zeiss).

Fig. 1. *Spirobacillus Cienkowskii*. Stade de bactérium à cellules ovales, pris chez une Daphnie de couleur grisâtre.

Fig. 2. État un peu plus avancé.

Fig. 3. État de bacille, pris chez une Daphnie de couleur gris pâle.

Fig. 4. Bacilles pris chez une Daphnie couleur grisâtre.

Fig. 5. Bacilles plus minces et plus recourbés (α), pris chez la même Daphnie, 12 heures après les bacilles de la figure 4.

Fig. 6. Bacilles recourbés, pris chez une autre Daphnie.

Fig. 7. Stade de transformation de bacille en spirille, pris chez la Daphnie de la figure 3, 19 heures plus tard.

Fig. 8. Suite de la transformation en spirilles, d'un autre exemplaire de Daphnie.

Fig. 9. État de spirillum complet.

Fig. 10. Redressement des spirilles et leur désagrégation.

Fig. 11. Désagrégation de spirilles en articles ovoïdes très petits.

Fig. 12. Bacilles recourbés provenant d'une Daphnie rouge.

Fig. 13. État de filaments après la mort de la Daphnie.

Fig. 14. État de sporulation.

1. V. Wasserzug, dans ces *Annales*, 1888, p. 75 et 153.

2. *Archives de Virchow*, 1889, N° 2, p. 284, Pl. IX. V. aussi ces *Annales*, t. II, p. 337.

NOTES DE LABORATOIRE

SUR LA PRÉSENCE DU VIRUS RABIQUE DANS LES NERFS.

Par E. ROUX.

Dans le premier numéro de ces *Annales* pour l'année 1888, nous avons fait connaître le résultat de nos recherches sur l'existence du virus rabique dans les nerfs de personnes qui avaient succombé à la rage¹. Nos investigations avaient porté sur des individus devenus enragés à la suite de morsures faites à l'un des membres. Si le virus rabique se propage le long des nerfs pour atteindre les centres nerveux, il n'avait pu suivre dans ces cas qu'un trajet bien défini, et on devait le rencontrer dans les troncs nerveux du membre mordu. Mais il ne suffit pas de montrer que le virus rabique existe dans les nerfs du membre blessé, pour conclure qu'il a cheminé le long de ceux-ci à partir de la morsure jusqu'à l'axe cérébro-spinal. On peut, en effet, supposer que, transporté au cerveau ou à la moelle par les voies sanguine ou lymphatique, il s'est étendu aux nerfs en allant du centre vers la périphérie. Pour répondre autant que possible à cette objection, nous avons inoculé par comparaison les nerfs du membre mordu et ceux du membre sain. Dans les cas rapportés dans notre mémoire de 1888, le virus rabique existait à la fois dans les nerfs du membre mordu et dans ceux du membre sain, mais il paraissait plus abondant dans les premiers, puisqu'ils ont donné, plus rapidement que les seconds, la rage aux animaux inoculés.

Depuis, nous avons eu l'occasion de faire de nouveaux examens de nerfs de personnes rabiques dans des circonstances favorables à la solution de cette question, à savoir : quelle voie suit le virus rabique pour aller de la morsure aux centres nerveux ?

1. Voir dans le même numéro de ces *Annales* le mémoire de M. P. Bardach et le mémoire de M. Vestea.

Cas n° 1. — D.-G., âgé de 6 ans, est mordu dans les premiers jours d'octobre 1887, par un chat inconnu qu'il a rencontré dans la rue. La blessure siégeait au pouce gauche près de l'ongle, elle était très légère mais avait donné quelques gouttes de sang. Les parents et l'enfant lui ont donné si peu d'attention qu'ils ne peuvent dire à quelle date précise elle a été faite. Trois semaines environ après la morsure l'enfant devient triste et ne veut plus jouer. Peu à peu son état paraît s'améliorer, et le dimanche 6 février 1888 il est assez gai. Le 7 février, au retour de l'école, il est somnolent et ne veut ni boire ni manger, pendant la nuit il est très agité. Le 8 février, il éprouve de la difficulté à boire et il se plaint de douleurs qui, partant de la main, s'irradient dans le bras, l'épaule et le côté gauche. Le 9 février, l'enfant est conduit à l'Institut Pasteur; il présente de l'aérophobie et de l'hydrophobie; ses pupilles sont dilatées et son regard a une expression singulière. Il a de la faiblesse des jambes, ressent de fréquentes envies d'uriner et d'aller à la selle. L'hyperesthésie de la main gauche est très marquée. Il est conduit à l'hôpital des Enfants-Malades, où il meurt dans la nuit du 13 au 14 février, après 6 jours de maladie déclarée.

L'autopsie est pratiquée le 15 février au matin : on enlève la portion du nerf radial qui se distribue au pouce gauche, sur toute la longueur du doigt, ainsi que les troncs nerveux du bras, au niveau de l'aisselle gauche, sur une étendue de 4 centimètres ; on enlève de même le paquet nerveux de l'aisselle droite. On broie à part le nerf radial et ensemble tous les nerfs de l'aisselle du côté mordu avec un peu d'eau stérilisée ; on fait de même avec les nerfs de l'aisselle du côté sain. Ces trois émulsions sont inoculées à forte dose, par trépanation, à trois lapins. Le bulbe est inoculé de la même façon à un autre lapin. Voici les résultats de ces inoculations :

Le lapin inoculé avec le bulbe a pris la rage le 15^e jour.

Celui inoculé avec les nerfs de l'aisselle du bras mordu était enragé le 35^e jour.

Celui qui avait reçu les nerfs de l'aisselle du bras sain était pris de rage le 36^e jour.

Enfin, le lapin qui avait reçu, sous la dure-mère, l'émuision faite avec le nerf radial était bien portant dix mois après l'injection.

Il semble donc que dans le cas de l'enfant D... G..., l'envasissement des nerfs par le virus se soit fait du centre à la péri-

phérie, puisque les nerfs du côté sain se sont montrés aussi virulents que ceux du côté mordu, et que le nerf spécial au pouce blessé ne paraissait pas contenir le virus rabique au moment de la mort. Le malaise éprouvé par l'enfant trois semaines après la morsure correspond probablement au début de la culture dans les centres nerveux. A ce moment on aurait peut-être pu mettre en évidence le virus rabique dans les nerfs du bras mordu, s'il avait été possible de les examiner. Il faut aussi remarquer que la durée de la maladie déclarée a été exceptionnellement longue chez D... (7 jours), et que pendant tout ce temps la culture du virus a pu s'étendre des centres nerveux aux nerfs périphériques, ce qui explique qu'il se trouvait au moment de la mort dans les nerfs des deux bras au niveau de l'aisselle.

Cas n° 2. — Le 9 mars 1888, G. G., garçon boucher, âgé de 22 ans, fut mordu dans la rue par un chien inconnu que l'on abattit à quelque distance de là, parce qu'il mordait d'autres chiens. La morsure faite à G... siégeait à l'éminence hypothénar de la main droite, elle était légère et fut lavée aussitôt chez un pharmacien avec de l'alcool camphré. Peu de jours après elle était cicatrisée. Vers le 5 juin, G..., qui n'avait pris aucune autre précaution, se sentit courbaturé : il était, disait-il, mal en train. Le 10 juin, il se plaignit de douleurs dans l'épaule droite; le 11, malgré un peu d'oppression, il fait son service dans la matinée. A une heure et demie, le même jour, il se met à table et mange, mais il ne peut boire; il quitte alors la table sans répondre aux questions qu'on lui fait. A huit heures du soir, il demande du thé dont il boit une partie; il se plaint de vives douleurs dans le bras droit, il est anxieux et son front est baigné de sueurs. Le 12 juin, G... est beaucoup plus malade, il suffoque et est très excité. Un médecin qui le voit alors pour la première fois, reconnaît la rage et l'envoie à l'Institut Pasteur. Il arrive dans un état d'exaltation extrême, il craint que ceux qui l'ont amené l'abandonnent et il ne veut pas rester seul. Les spasmes sont fréquents, l'hydrophobie et l'aérophobie très marquées, les forces sont conservées et le bras n'est plus douloureux. G... est conduit à l'Hôtel-Dieu; il meurt le 13 juin à 6 heures du matin.

L'autopsie est faite le 14. Les troncs nerveux du bras mordu, pris au niveau de l'aisselle, servent à inoculer deux lapins par trépanation. Deux lapins sont inoculés de même avec le paquet nerveux de l'aisselle du côté sain. Aucun de ces animaux n'a

pris la rage. Ceux inoculés avec le bulbe étaient enragés au bout de 15 jours¹.

Cas n° 3. — Le nommé C., ouvrier sellier (âgé de 30 ans environ), succombe à la rage du 13 au 14 juillet 1888, à l'Hôtel-Dieu. La famille ne peut dire si C... a été mordu, elle sait seulement que six semaines environ avant sa mort, C... mit sa main droite dans la gueule d'une petite chienne qu'il avait; cette bête était malade, elle avait la mâchoire pendante, et ne pouvait avaler². Croyant qu'elle avait un corps étranger dans la gorge, C. voulut l'en débarrasser. On ne sait s'il avait des blessures à la main; cependant un habitant de la maison prétend avoir vu C... avec une plaie à la main droite dans le temps où sa chienne était malade. Dans la dernière moitié du mois de juin, le caractère de C... s'était modifié, il était devenu extrêmement affectueux dans sa famille, et se montrait au contraire très irritable à l'atelier. Ceux qui vivaient avec lui avaient aussi remarqué l'expression hagarde de ses yeux. Le 8 juillet, à 3 heures de l'après-midi, il est heurté, au côté droit, par le brancard d'une voiture à bras. Il rentre chez lui très pâle, il se plaint de vives douleurs dans le côté frappé, et refuse de manger. Le 9 et le 10 juillet, il travaille à l'atelier. Le 11 au matin, il boit difficilement, mais se rend cependant au travail; à 5 heures du soir, il quitte l'atelier à cause des vives douleurs qu'il ressent dans le bras droit, il a aussi un peu de gêne respiratoire. Le 12, l'aérophobie apparaît, et l'hydrophobie est très marquée, l'excitation est extrême: il délire, au point qu'un médecin du quartier, appelé à lui donner des soins, déclare que C... est dans un accès de manie aiguë, et le fait conduire au dépôt de la Préfecture de police, où il arrive le vendredi 13, à 5 heures du soir. Le médecin de service reconnaît aussitôt la rage, et fait transporter le malade à l'Hôtel-Dieu, où il meurt dans la nuit.

A l'autopsie faite le 15 juillet, on enlève le nerf cubital et le

4. A l'autopsie de G., on remarque qu'un des ganglions lymphatiques, de l'aiselle du côté mordu, était volumineux et rouge. Ce ganglion fut enlevé avec précaution, broyé dans un peu d'eau stérilisée. Le liquide trouble ainsi préparé fut injecté sous la peau d'un cobaye. Ce cobaye mourut le 1^{er} juillet avec les symptômes de la rage et sans lésions des organes. Avec son bulbe, on inocula, par trépanation, un second cobaye qui présenta des symptômes rabiques le 19 juillet. Dans plusieurs autopsies de personnes enragées, nous avons trouvé les ganglions lymphatiques, de la racine du membre mordu, rouges et tuméfiés, mais, inoculés, ces ganglions n'ont jamais donné la rage. L'exemple que nous venons de citer est le seul ou nous ayons trouvé le virus rabique dans les glandes lymphatiques.

2. Un chien mordu par la chienne de C... est mort de rage;

nerf médian à la partie moyenne de l'avant-bras du côté mordu. On enlève les mêmes nerfs du côté sain, et on inocule avec chacun de ces troncs nerveux un lapin par trépanation.

Le lapin inoculé avec le nerf cubital du côté mordu a été pris de rage après 50 jours.

Celui inoculé avec le nerf médian du côté mordu était enragé le 19^e jour.

Les lapins qui ont été inoculés avec les nerfs du côté sain sont restés bien portants pendant plus de dix mois.

Un lapin inoculé par trépanation avec le bulbe était enragé après 14 jours d'incubation.

Dans ce cas, le virus rabique existait donc dans les nerfs du côté mordu et ne se trouvait pas dans les nerfs du côté sain. Le changement survenu dans le caractère de C..., trois semaines avant l'apparition des symptômes rabiques, indique que c'est sans doute à cette époque qu'a commencé la culture du virus dans les centres nerveux ; il y était parvenu en suivant les nerfs, et cependant les douleurs n'ont été ressenties dans le membre mordu que le 11 juillet, au moment où la rage était déjà confirmée. Le cheminement du virus peut donc se faire le long d'un nerf, pendant un temps plus ou moins long, sans donner lieu à aucun symptôme. Les manifestations rabiques aiguës sont survenues chez C... à la suite d'un coup violent qu'il a reçu. Il n'y a probablement pas autre chose qu'une coïncidence entre le choc subi le 8 juillet et l'apparition de la rage le 10 au soir. Dans les observations de rage¹ on signale fréquemment des cas où l'accès rabique apparaît chez les personnes mordues à la suite d'un accident de ce genre. Ces cas sont trop nombreux pour que l'on n'établisse pas une relation entre l'explosion brusque de la maladie et le traumatisme ou l'émotion dont vient de souffrir l'individu en puissance de rage.

Cas n° 4. — M., soldat, âgé de 23 ans, est mordu à la main droite, par un chien enragé, le 15 février 1888. Ce chien était poursuivi dans la rue, parce qu'il mordait tous les animaux de son espèce qu'il rencontrait. M... traversa le ventre du chien avec son sabre-baïonnette, et cloua l'animal au sol, mais celui-ci en relevant la tête put atteindre sa main droite, et lui fit de nombreuses blessures contuses. Elles furent

¹: Gamaleïa, dans ces *Annales*, t. I, p. 63.

touchées avec de l'ammoniaque presque aussitôt, et cauterisées au thermocautère, à l'Hôpital militaire, 1/4 d'heure après avoir été faites. Lorsque M... vint suivre le traitement à l'Institut Pasteur, on compta : 1^o au pouce, une forte morsure contuse intéressant la dernière phalange du pouce; 2^o cinq morsures à la base du pouce; 3^o une morsure sur l'éminence thénar; 4^o une morsure ayant traversé l'ongle de l'index et pénétré dans la pulpe du doigt; 5^o une plaie à la deuxième phalange du médius; 6^o une morsure à la deuxième phalange de l'annulaire, et enfin des coups de dents qui ont pénétré sous les ongles du médius et de l'annulaire.

M... suivit le traitement à l'Institut Pasteur, et retourna à son corps le 5 mars. Peu de temps après, des picotements se firent sentir dans la main mordue, qui était comme engourdie. Puis vinrent une sensation de lourdeur et un affaiblissement de la force musculaire. Ces symptômes restèrent localisés jusqu'au 29 mars. Ce jour, M... éprouva des douleurs très vives dans la main droite, douleurs qui, partant du petit doigt, remontaient dans le membre en suivant le trajet du nerf cubital, et présentant leur maximum au niveau du tiers moyen du bras. D'autre part, il avait de la céphalalgie, une légère agitation, et il ne put pas prendre son repas du soir. Pendant la nuit du 29 au 30 mars, l'agitation augmenta, et le 30 au matin, lorsque M... voulut boire, il ne put le faire à cause des spasmes du pharynx et de la dyspnée causée par le contact de l'eau avec les lèvres. Il se rendit alors à l'hôpital du Val-de-Grâce, où il succomba le 1^{er} avril, à 6 heures du matin, après avoir présenté, avec une grande intensité, tous les symptômes de la rage convulsive¹.

L'autopsie fut pratiquée 27 heures après la mort. Outre la congestion de l'encéphale et l'œdème des méninges, on remarqua que les nerfs du bras droit étaient plus rouges que ceux du bras gauche. On enleva le nerf cubital et le nerf radial au milieu de l'avant-bras mordu, et le paquet nerveux de l'aisselle du même côté. De même, le nerf cubital, le nerf radial et les troncs nerveux de l'aisselle furent pris du côté sain. L'inoculation par trépanation de ces nerfs à des lapins donna les résultats suivants :

Le lapin inoculé avec le cubital du côté mordu prit la rage après 20 jours d'incubation.

Celui inoculé avec le paquet nerveux de l'aisselle du côté mordu devint enragé trois mois et demi après l'inoculation.

1. Ces renseignements sont extraits de l'observation qui m'a été obligamment communiquée par M. Laveran, professeur au Val-de-Grâce.

Celui inoculé avec le nerf radial du côté mordu resta bien portant, ainsi que ceux qui avaient reçu l'émulsion des nerfs radial et cubital et celle faite avec les troncs nerveux pris au niveau de l'aisselle du côté sain.

Le lapin inoculé avec le bulbe devint enragé après onze jours d'incubation.

Les douleurs éprouvées par M... au début de sa maladie partaient du petit doigt de la main droite pour suivre le trajet du nerf cubital, et c'est en effet dans le nerf cubital que l'on trouve le virus rabique qui n'existe pas dans le nerf radial. Il paraît donc certain que dans ce cas c'est par les blessures faites à l'annulaire que le virus rabique a pénétré, et qu'il s'est propagé le long du cubital pour atteindre les centres nerveux. L'observation clinique et l'expérimentation sont ici tout à fait d'accord.

L'inoculation des nerfs et du bulbe de M... ont donné lieu à d'autres observations intéressantes. On sait que chez le lapin la rage est le plus souvent paralytique, et que c'est par la paralysie du train postérieur que débute en général la maladie. Cette paralysie des pattes de derrière devient de plus en plus complète, puis elle s'étend aux pattes de devant, et pendant plusieurs jours l'animal reste inerte, les muscles respiratoires sont les seuls qui fonctionnent encore. Il est rare d'observer chez le lapin une rage furieuse ou convulsive analogue à celle qui est très fréquente chez l'homme et chez le chien. Dans le nombre si considérable de lapins rabiques que nous avons eu l'occasion d'observer au laboratoire de M. Pasteur, nous n'avons vu de lapins enragés furieux que dans les premiers passages de la rage du chien au lapin. Mais la matière nerveuse de ces lapins, inoculée à d'autres, leur donnait la rage paralytique, et l'on revenait ainsi aux symptômes réguliers de la maladie. Dans les passages d'ordre élevé, la rage convulsive ne se rencontre plus. Dans le n° 5 (1888) de ces *Annales*, M. Helman a publié un mémoire sur la rage furieuse du lapin, rage qu'il a pu entretenir depuis 1885, par passage de lapin à lapin, en lui conservant son caractère¹.

1. M. Högyes a observé 167 fois la rage furieuse sur 476 lapins inoculés. V. le mémoire de M. Högyes, *Le virus rabique des chiens des rues, dans ses passages de lapin à lapin*. Ann. de l'Institut Pasteur, mars 1888.

Après 60 passages les lapins mouraient encore de rage furieuse.

Les lapins inoculés avec le nerf cubital et le bulbe de M... ont été atteints de rage furieuse, l'un après 20 jours, l'autre après 11 jours d'incubation. Cette forme de rage s'est maintenue dans les passages qui ont été faits de lapin à lapin par M. Viala, aide-préparateur au laboratoire. Dans 24 passages successifs, la durée de l'incubation a varié de 11 jours à 8 jours. Les premiers symptômes se manifestaient par de l'inquiétude chez les lapins, qui se tenaient cachés, la tête dans un coin de leur cage ou sous leur litière. De temps en temps ils grattaient le plancher avec fureur et s'élançaient contre les barreaux, ils se jetaient sur une baguette qu'on leur tendait et la mordaient violemment. Ils avaient des accès de convulsions violentes que l'on pouvait provoquer en les excitant, et ils mouraient beaucoup plus rapidement que dans la forme paralytique. La maladie ne durait quelquefois que 24 heures. On avait toujours eu soin d'inoculer deux animaux à chaque passage et de prendre le virus pour le passage suivant sur celui qui était le plus furieux. Dès le 7^e passage, on remarquait, en effet, que sur les deux animaux, l'un était moins agité que l'autre, et que des signes de paralysie, se manifestaient dans son train postérieur malgré cette manière de faire ¹. Dès le 22^e passage, les lapins présentaient une forme de rage mixte commençant par de l'agitation et des convulsions et finissant par la paralysie. Les animaux du 25^e passage étaient nettement paralysés, et chez eux la durée de la rage confirmée était de 5 jours. A partir de ce passage on était revenu à la rage paralytique.

Les lapins inoculés avec le paquet nerveux de l'aisselle du côté mordu prirent rage 3 mois et demi après l'inoculation. Au lieu d'avoir la forme furieuse comme ceux qui avaient reçu le bulbe et le nerf cubital, ils présentèrent d'emblée la rage paralytique. De sorte que deux nerfs différents du même individu donnèrent chacun une des formes de la maladie. C'est une preuve de plus que le virus de la rage paralytique et celui de la rage furieuse ne sont qu'un seul et même virus, et il nous est très difficile de comprendre pourquoi dans quelques cas on obtient une rage furieuse transmissible de lapin à lapin.

1. Précautions recommandées par M. Helman pour maintenir la forme convulsive dans les passages.

Les quatre observations de rage que nous venons de citer montrent que la maladie n'éclate pas brusquement, ainsi qu'on le pense généralement. Lorsqu'on interroge avec soin les personnes qui vivent avec les individus mordus, on apprend presque toujours qu'une période de malaise, parfois fort longue¹, a précédé l'apparition des symptômes rabiques caractéristiques. Cette période de rage latente se rencontre aussi chez les animaux inoculés, ainsi qu'on peut le voir par la lecture des Mémoires de M. Ferré et de M. Högyes² qui ont été publiés dans ces *Annales*. Nous-même, nous avons montré que, dès le quatrième jour après l'inoculation intra-cranienne du virus fixe au lapin, on peut retrouver le virus dans le bulbe et la moelle allongée, bien que l'animal paraisse en parfaite santé et que la culture du virus dans les centres nerveux ne se traduise, à ce moment, que par le changement du rythme respiratoire et les variations dans la température signalés par MM. Ferré, Högyes et Babès. Cette période latente est fort utile à connaître chez l'homme, parce qu'elle explique pourquoi le traitement antirabique échoue dans certains cas, quand il est entrepris trop tard ou quand l'incubation de la rage est très courte. Cependant, nous pensons que parfois il est efficace, même entrepris pendant cette période prémonitoire, et nous avons toujours présente à l'esprit l'histoire d'une femme mordue par un chien enragé au côté gauche du nez, qui, après avoir suivi le traitement, ressentit dans ce côté des élancements et des fourmillements, en même temps que la sensibilité de la peau était très émoussée. Elle éprouvait aussi beaucoup d'agitation, particulièrement la nuit; elle revint à l'Institut Pasteur faire part de ces symptômes alarmants; elle subit un traitement supplémentaire et depuis deux ans elle est en bonne santé.

1. V. Gamaleia, *l. c.*

2. Ces *Annales*, t. II, p. 437 et 487.

SUR LA CONSERVATION DES MICROBES

Par M. E. DUCLAUX.

L'intérêt de la question du mode et de la durée de la conservation des microbes est double. Au point de vue général, elle nous renseigne sur les conditions dans lesquelles il faut se mettre pour assurer la destruction des germes nuisibles ou la conservation des espèces utiles à nos besoins et à notre industrie. Pour les laboratoires, son intérêt est plus pratique et plus immédiat. Quand il s'agit d'attribuer un nom à une espèce qu'on vient de rencontrer, de la donner comme nouvelle ou de l'identifier avec une espèce connue, il n'y a pas de dessin ou de photographie, si parfaite qu'on la suppose, qui puisse remplacer une comparaison faite sur l'heure, par des ensemencements simultanés dans les mêmes milieux des espèces dont on suppose la similitude, et par l'examen de jour en jour de ces cultures. Je ne dis pas que cette méthode soit sûre, qu'on doive nécessairement séparer deux microbes entre lesquels on relève certaines différences, ni identifier deux êtres qui montrent de la ressemblance. Je dis seulement que cette méthode est une des plus sûres, et même à peu près la seule sûre quand on n'a pas la ressource de l'inoculation sur des êtres vivants.

MM. Soyka et Kräl ont, il est vrai, proposé¹ un moyen d'obtenir des cultures durables, et de constituer à leur aide une sorte de musée bactériologique destiné à fournir des documents dans les laboratoires ou dans les leçons publiques. Ils ont décrit avec détail les moyens de conserver des cultures sur tranches de pommes de terre enfermées [dans des récipients cylindriques hermétiquement clos, ou des cultures sur plaque de gélatine ou de gélose dans des flacons plats qu'on ferme avec de la paraffine. Il est clair qu'on protège ainsi une culture contre l'évaporation et contre les impuretés, mais on ne la protège pas contre la vieillesse] et les modifications de forme, de couleur et d'aspect

1. *Zeitschrift f. Hygiene*, 1888, p. 143.

qu'elle amène. Il faut toujours, pour l'étude et la comparaison, revenir à la forme jeune, c'est-à-dire à un ensemencement nouveau.

Les cultures en surface sur la gélatine se prêtent mal à cette nécessité d'avoir des semences toujours prêtes. Elles périssent très vite, peut-être à cause de la libre action de l'air et de la lumière, peut-être pour d'autres causes. Toujours est-il qu'il faut les renouveler fréquemment, et que cette besogne est ennuyeuse. Dans mon Traité de microbiologie et dans un mémoire *Sur la durée de la vie des germes de microbes* publié en 1885¹, j'avais montré que les meilleures garanties de durée étaient la conservation à l'abri de l'air dans un liquide légèrement alcalin, et j'avais proposé, pour la réaliser, la pratique simple qui consiste à aspirer dans de petites ampoules à double effilure les liquides nutritifs dans lesquels les microbes avaient terminé leur évolution. Lorsque ces microbes sont des fermentes des matières albuminoïdes, les liquides nutritifs deviennent assez rapidement alcalins. L'ampoule aux 3/4 pleine, on la ferme aux deux extrémités. Il n'y a pas besoin de la stériliser, car si elle est assez fine, ses parois ont été portées au rouge au moment où on l'a fabriquée et fermée à ses deux extrémités. Il suffit de casser les deux effilures flambées avec une petite pince flambée pour pouvoir, en soufflant, introduire dans un nouveau matras la gouttelette de liquide de l'ampoule. sans avoir à craindre, si on ne la vide pas complètement, que l'air qu'on y insuffle apporte dans la partie ensemencée des germes étrangers.

Les plus vieilles des ampoules que j'ai ainsi préparées en y introduisant des germes purs datent aujourd'hui de dix ans, pendant lesquels les ampoules, enfermées dans un tube à essais, sont restées dans des tiroirs rarement ouverts. J'ai pensé à refaire après dix ans, sur elles, l'expérience que j'avais faite après cinq ans dans le mémoire ci-dessus cité, à savoir si elles renfermaient encore des germes vivants.

Elles se partageaient en deux séries. Les unes contenaient les germes de quelques-uns des *Tyrothrix* de mes études sur le lait, c'est-à-dire des êtres que je connaissais bien, et à chacun desquels je pouvais donner son milieu nutritif le plus favorable. Les autres renfermaient des spores de bacilles rencontrés inop-

1. *Annales de chimie et de physique*, 6^e S., t. V.

nément, peu ou pas connus dans leurs propriétés, et recueillis surtout pour devenir plus tard des matériaux d'études qui n'ont pas été faites.

Sur la première série, je peux être très bref, car toutes les espèces que j'avais emmagasinées en 1878 sont restées vivantes après 10 ans. Elles sont au nombre de huit : ce sont les *Tyrothrix tenuis*, *filiformis*, *distortus*, *geniculatus*, *turgidus*, *scaber*, *urocephalum* et l'*Actinobacter polymorphus*.

Pour les deux premiers, je les avais trouvés vivants après 25 ans de séjour dans un ballon scellé contenant une infusion qu'ils avaient peuplée et dont ils avaient peu à peu fait disparaître tout l'oxygène. Les conditions de conservation étaient donc, à très peu près, celles de mes ampoules : il n'y a donc pas à s'étonner de la vitalité de ces deux bacilles après 10 ans ; elle peut probablement durer bien davantage.

Les autres n'avaient pas été éprouvés à ce point de vue. Je les avais trouvés vivants en 1884, après 5 ans. Les voilà arrivés au double de cet âge sans faiblir, car, ensemencés dans un milieu convenable, ils se développent encore en 24 heures.

S'ils étaient pathogènes, il y aurait à se demander si leur virulence persiste. Un mémoire prochain de M. Roux répondra à cette préoccupation.

L'*Actinobacter polymorphus* mérite une mention spéciale. Dans mon mémoire de 1885, j'avais trouvé qu'il était mort après 5 ans dans une culture de lait conservée en ampoules. La semence que j'ai trouvée vivante après 10 ans provenait aussi d'une culture dans le lait. Cette contradiction n'est sans doute qu'apparente, et tient à ce que la réaction terminale d'une culture de ce microbe dans le lait est variable avec la marche variable de la fermentation, qui dépend de la quantité d'air en présence. Le lait peut ou bien rester acide, ou devenir à peu près neutre, ou même alcalin. Tel était le cas dans l'ampoule où la vie avait persisté après 10 ans. Celle où la semence était morte après 5 ans renfermait sans doute un liquide acide.

J'arrive maintenant à la série d'essais ayant porté sur des bacilles dont je ne connaissais pas bien les propriétés, et auxquels je n'étais pas sûr, malgré la variété des milieux dans lesquels je les ai ensemencés, d'offrir celui qui leur était le plus favorable. J'ai montré, dans le mémoire cité plus haut,

que les conditions de rajeunissement d'un microbe sont beaucoup plus étroites que celles de sa transplantation lorsqu'on le retire d'un milieu où il est bien portant. Il peut alors s'accommoder de liquides nutritifs qui ne conviendraient pas au rajeunissement des spores.

C'est là sans doute ce qui nous explique que sur 8 espèces ensemencées, 2 seulement aient été retrouvées vivantes après 10 ans. Rien ne les distingue à l'origine de celles que j'ai signalées plus haut et qui sont restées toutes vivantes, il est probable qu'il y avait ici beaucoup de morts apparentes. Je ne voudrais pourtant pas dire qu'elles l'étaient toutes. Il est certain qu'il y a des espèces fragiles, et d'autres qui ne sont pas. Les *Tyrothrix* que j'ai rencontrés dans les fromages et étudiés, sont très répandus, et ont évidemment pris la solidité d'allures que donne une longue acclimatation dans un même pays et dans un même milieu. Je ne peux pas assurer qu'il en soit de même des autres. Quoi qu'il en soit, on voit que ce mode de conservation dans des liquides soustraits à l'action de l'air assure une longue durée de conservation aux microbes des matières albuminoïdes, et permet d'avoir, pour ainsi dire sans les renouveler, des semences toujours prêtes.

Je dois dire, en terminant, qu'il serait imprudent de généraliser ces conclusions. Les levures, par exemple, s'accommodent fort mal de la conservation en tubes clos, tandis que je viens de retrouver très vivante une levure conservée depuis 1873, c'est-à-dire depuis plus de 15 ans, au contact de la bière qu'elle avait produite, dans un grand ballon de verre communiquant avec l'atmosphère extérieure par un tube effilé en col de cygne. Cette bière, qui titre aujourd'hui 3,4 % d'alcool, contient encore du glucose et de la dextrine, et est restée parfaitement saine. Ceci prouve que les conditions d'une bonne conservation ne sont pas les mêmes pour tous les microbes. Il y a là une étude à faire, qui ne peut pas être improvisée, car le temps est un de ses éléments importants, et que je continuerai, au fur et à mesure que vieilliront, dans mes réserves, les matériaux nécessaires.

REVUES ET ANALYSES

SUR LE ROLE DES MICROBES DANS LA VÉGÉTATION.

REVUE CRITIQUE.

HELLRIEGEL ET WILFARTH. Recherches sur la nourriture azotée des graminées et des légumineuses. Annexe au *Zeitschrift des Vereins f. d. Rubenzucker Industrie d. D. R.*, nov. 1888, Berlin, et *Bericht d. 59^e et 60^e Versammlung deutsch. Naturforsch. in Wiesbaden*, 1886 et 1887.

Ce n'est pas seulement la médecine que les microbes sont en train de transformer. Voici l'agriculture qui commence à les trouver là où elle ne soupçonnait pas leur présence. Après avoir découvert en eux les grands producteurs de l'acide carbonique qui est l'aliment des plantes vertes, elle a dû leur attribuer le rôle principal dans la fabrication des fumiers, dans la formation de l'humus, dans la production des nitrates et de l'ammoniaque atmosphérique. Elle avait dû toutefois constater dernièrement, avec regret, que de si bons serviteurs faisaient parfois des sottises, et qu'ils présidaient avec une activité fâcheuse au départ, à l'état d'azote gazeux, d'une partie de l'azote organique des fumiers, et plus généralement de celui de la matière vivante. Or, chez l'agriculteur, l'azote gazeux passe pour une non-valeur, et sa production pour une perte sèche. Heureusement pour les microbes, un procès de réhabilitation est commencé, et deux savants allemands, MM. Hellriegel et Wilfarth, s'efforcent de démontrer que le retour de l'azote gazeux à l'état d'azote organique est encore une affaire d'infiniment petits.

Jusqu'où sont-ils arrivés dans cette démonstration? C'est ce que je voudrais essayer de préciser dans cet article. J'aurais pu parler déjà de cette question, qui est des plus intéressantes au double point de vue théorique et pratique. Les premières publications de M. Hellriegel sur ce sujet datent en effet de 1886. Mais elles étaient incomplètes et incapables d'emporter les convictions. A côté des preuves les plus évidentes d'habileté opératoire, on y trouvait des marques de l'inexpérience des auteurs sur le terrain bactériologique qu'ils étaient conduits à aborder : et des taches qui eussent à peine été remarquées si la thèse

plaidée avait été banale, prenaient tout de suite une grande importance quand on songeait qu'il s'agissait de revêtir des bactéries du rôle nouveau, imprévu et important d'agents d'utilisation de l'azote de l'atmosphère. Mais tout dernièrement MM. Hellriegel et Wilfarth ont publié un mémoire étendu dans lequel ils résument toutes leurs expériences, et qui est fait pour ne pas passer inaperçu. Disons tout de suite qu'on n'y trouve pas, au sujet du point capital qui nous occupe, une de ces expériences topiques sur lesquelles il n'y a rien à redire, qui emportent les convictions, et qu'il suffirait de raconter pour mettre en pleine lumière le rôle nouveau des bactéries. Les savants allemands ont procédé autrement, par une accumulation de faits soigneusement observés, par une discussion serrée des causes d'erreur. C'est une autre manière d'imposer la conviction, mais elle exige plus de longueur dans l'exposé, et plus de patience chez le lecteur. J'essaierai d'abréger en ne prenant dans le mémoire analysé que ce qui est relatif aux migrations de l'azote, et en indiquant la conclusion des expériences sans en citer les données pratiques et numériques, toutes les fois que les résultats me paraîtront indiscutables et bien assis.

MM. Hellriegel et Wilfarth s'étaient proposé dans leur travail de faire pour les grandes plantes de culture ce qu'avait fait pour l'*Aspergillus niger* M. Raulin, dont ils ne prononcent pas le nom, dont ils semblent même ne pas connaître les travaux, mais dont ils reproduisent le programme. Pour juger de l'effet utile d'une substance sur une culture, disent-ils avec raison, il faut remplir deux conditions. La première est que, sur un sol artificiel, dont on connaît bien la composition élémentaire, la plante puisse parcourir jusqu'au bout le cycle de son évolution, et arriver à donner ses fruits. La seconde est que le poids de plante sèche, récoltée dans ces conditions sur une surface donnée, soit assez constant pour que toute modification dans l'accroissement de la plante, survenue à la suite d'un changement quelconque apporté dans les conditions de l'expérience, puisse être rapportée sûrement à l'influence de ce changement.

Il y a une des conditions posées par M. Raulin que MM. Hellriegel et Wilfarth n'ont pas insérée dans leur programme, c'est que le poids de plante type, celui qui sert de comparaison pour les divers essais, soit aussi grand que possible, de façon à ce que tout changement apporté dans les conditions du milieu nutritif se traduise par une diminution de récolte d'autant plus appréciable que le poids de récolte type sera plus élevé. Mais cette condition, ils l'ont en revanche à peu près réalisée dans leurs résultats. Ils sont arrivés en effet à obtenir sur un milieu artificiel, et dans des pots de verre ayant environ 176 centimètres carrés de surface, des poids de 25 grammes de récolte sèche, ce qui représente un rendement égal à celui de belles récoltes industrielles.

Ces vases contiennent les uns 4 kilogrammes, les autres 8 kilogrammes d'un sable quartzez très pauvre en azote, car on en a trouvé au plus, par la méthode de Kjeldahl, 0^{gr},0054 par kilogramme, et celui des dernières expériences en contenait moins de 1 milligramme par kilogramme. Il y a en outre des traces impondérables d'acide phosphorique, et de très faibles quantités de potasse, de soude, de chaux, de magnésie et d'acide sulfurique, dont l'origine est à rechercher dans des fragments de feldspath en décomposition, de mica et d'hornblende. Ce sable est mélangé avec une solution nourricière contenant par litre, 0^{gr},136 de phosphate de potasse, 0^{gr},073 de chlorure de potassium, 0^{gr},060 de sulfate de magnésie et des quantités variables de nitrate de chaux. Le mélange en grumeaux est introduit dans les vases, où il repose sur un lit de fragments de quartz lavé qui sert de drainage, et on y implante les graines, après les avoir fait lever entre des doubles de papier à filtre, et avoir choisi celles qui sont à la fois les plus belles et les plus régulières. Pour plus de sûreté, on met sur chaque vase un nombre de plantes double de celui qu'on veut conserver et, au bout de quelques jours, on arrache les moins bien venues, en enlevant en même temps ce qui reste des graines.

Les vases sont laissés à l'air libre, mais peuvent être roulés sous un abri couvert, au moyen d'un wagonnet, dans les cas de pluie ou de vent. Ils sont soumis à des pesées journalières, et chaque jour on remplace par de l'eau distillée privée d'ammoniaque l'eau perdue par évaporation ou transpiration.

Pour abréger, nous n'envisagerons que les expériences dans lesquelles le sol artificiel avait été débarrassé des microbes qu'il renferme d'ordinaire. Pour cela les auteurs portent pendant 2 heures à une température de 150° leur sol artificiel et le quartz qui sert de drainage, placent ensuite le tout, aussi rapidement que possible, dans le vase de verre préalablement lavé avec une solution de sublimé à 1 pour 1,000 et rincé à l'alcool absolu : enfin ils recouvrent le tout avec une couche d'ouate stérilisée. Malgré toutes ces précautions et celle de chauffer d'avance à l'ébullition les solutions nutritives dont on doit imbibier la terre des vases, et l'eau d'arrosage, il est clair que les microbes doivent rapidement reprendre possession du sol. MM. Hellriegel et Wilfarth le reconnaissent du reste, mais, comme nous allons le voir bientôt, ce qu'il y a d'essentiel n'est pas d'éliminer tous les microbes, mais seulement quelques espèces dont ces méthodes suffisent à prévenir l'invasion.

Cela posé, voici les résultats relatifs à l'azote, les seuls dont nous nous occuperons parce que ce sont les seuls qui rentrent dans le cadre de ce journal. Quand, dans ce sol stérilisé, on n'ajoute pas de nitrate, on voit la plante pousser à peu près normalement jusqu'à ce qu'elle

ait épuisé les réserves de sa graine. A ce moment commence pour elle une période de vie pénible, qui dure à peu près aussi longtemps que celle des plantes ayant une nutrition suffisante, et va d'ordinaire jusqu'à la formation du fruit, mais la végétation prend des allures naines; chaque organe nouveau semble se former aux dépens d'un organe ancien, d'une feuille qui s'épuise et se flétrit, et le poids de la récolte sèche est à peine supérieur au poids des graines mises à germer.

L'addition d'un peu de nitrate se traduit alors par une augmentation sensible dans la récolte; celle de 2 millionièmes de nitrate est déjà très sensible, et quand on arrive à 0^{er},056 de nitrate dans un vase renfermant 4 kilogrammes de terre, c'est-à-dire à 1 de nitrate pour 70,000 de sol, le poids de la récolte augmente proportionnellement au poids de nitrates, si le reste des aliments est en quantité suffisante. On peut donc, comme l'avait fait M. Raulin, exprimer la valeur nutritive de l'azote des nitrates par un nombre, et dire que l'excès de récolte, produit par l'introduction dans le sol artificiel de 1 milligramme d'azote, est de 93 milligrammes environ pour l'orge, de 96 milligrammes pour l'avoine, de 50 milligrammes pour le pois, etc.

Ces nombres sont évidemment des nombres approximatifs, et ne peuvent guère être autre chose: la plante n'est pas un composé chimique ayant toujours la même constitution, la dose d'azote qu'elle contient varie, etc. Mais quand on voit ces chiffres se reproduire avec leurs valeurs d'une année à l'autre, malgré l'influence variable des conditions météorologiques sur la croissance, le tallage, la maturation des plantes, on ne peut qu'en tirer les inductions les plus favorables au sujet de l'habileté des expérimentateurs, et du soin apporté à leurs expériences.

Cette bonne impression n'est pas à dédaigner, car à côté des faits qui précédent, on en trouve qui déconcertent. Tout ce que nous venons de dire des cultures en sol stérilisé s'applique également aux céréales, orge, avoine, et aux légumineuses, pois, lupin, sainfoin, etc. Mais si on n'a pas stérilisé, au point de vue des microbes, le sol des vases, les résultats sont très différents pour ces familles végétales. Les graminées ne changent pas d'allures, et continuent à ne donner que des récoltes nulles ou insignifiantes dans les sols où on n'a pas ajouté de nitrates. Mais dans ces sols les légumineuses ont les allures les plus capricieuses. Dans certains vases, elles prennent patron sur les graminées et restent chétives. Dans d'autres, en apparence tout à fait identiques aux premiers, elles prennent un développement exorbitant. D'autres fois, c'est dans le même vase que quelques pieds restent chétifs et que d'autres grandissent et grossissent comme s'ils avaient leur ration de nitrates.

Les pieds qui ont des sorts si différents se ressemblent pourtant

beaucoup à l'origine, et jusqu'au moment où ils ont épuisé les réserves de la graine. A ce moment ils souffrent tous et sont dans un état d'inanition, de *faim d'azote*; chaque nouvelle feuille est plus petite que les précédentes, et à mesure qu'elle se forme, les anciennes se vident et se dessèchent. La tige est grêle, la coloration générale jaunâtre et malaïve. Puis, subitement, ou du moins en quelques jours, tout change. La couleur repasse au vert, les folioles de la dernière feuille grandissent et grossissent plus que leurs ainées, le développement reprend vigoureusement, et les hauts des tiges ont souvent un diamètre supérieur à celui de la base, si bien qu'il est non seulement impossible de trouver pour ces plantes, qui semblent vivre de l'air du temps, aucune correspondance entre le poids de plante et le poids d'aliment azoté fourni par le sol, mais encore qu'on trouve à l'analyse, dans ces pieds à l'aspect tout à fait normal, des quantités d'azote organique qui dépassent de plusieurs centaines de milligrammes celles qui existaient à l'origine dans le sol et les graines.

MM. Hellriegel et Wilfarth n'ont pas de peine à montrer que ces résultats, constants chez eux, et qui ont été retrouvés ailleurs, ne peuvent s'expliquer par aucune des hypothèses admises actuellement sur l'origine de l'azote des plantes. On sait, il est vrai, que les légumineuses ont à ce point de vue des propriétés spéciales. On peut tirer d'une terre de belles récoltes de trèfle, de sainfoin, de luzerne, sans lui fournir d'engrais. Ces récoltes emportent deux fois plus d'azote qu'une récolte de blé faite sur la même surface, et cependant, au lieu d'appauvrir le sol, elles l'enrichissent en composés azotés; si bien que, rompues et remplacées par du blé, les légumineuses permettent une belle récolte de céréales sur un sol qui n'a en apparence reçu aucune fumure.

A quelle source empruntent-elles l'azote qu'elles emportent et celui qu'elles laissent dans le sol? La première idée est de la chercher dans l'air. Mais, dans une série d'expériences restées classiques, M. Boussingault avait vu des légumineuses cultivées dans un sol stérilisé, et dans une atmosphère limitée, ou dans un courant d'air absolument dépouillé de ses produits azotés, ne contenir à l'état de plante vivante qu'une quantité d'azote toujours inférieure à celle de la graine, et ces résultats, confirmés par Lawes, Gilbert et Pugh, avaient pris pied dans la science, malgré les contestations de M. G. Ville¹.

Ne trouvant rien de ce côté, on avait attribué aux légumineuses la faculté de tirer un meilleur profit que les autres plantes des traces d'azote combiné qui existent dans l'air, et cela à raison du développement de

1. Il y aurait une étude curieuse à faire, ce serait de reviser avec nos connaissances actuelles et surtout avec les faits nouveaux apportés par MM. Hellriegel et Wilfarth le procès si longtemps pendant et si vivement plaidé entre MM. Boussingault et G. Ville. Mais ce serait sortir du cadre de ce journal.

leurs organes foliacés et de la durée de leur végétation. Mais il y a si peu, dans l'air, de ces combinaisons azotées, et les excédents d'azote, qui ont dépassé parfois 1 gramme par pot, dans les expériences de MM. Hellriegel et Wilfarth, sont tellement considérables, qu'on ne peut songer à invoquer cette origine.

Dans une autre hypothèse, les légumineuses vont simplement puiser dans le sous-sol, à l'aide de leur système radiculaire profond et développé, les matériaux azotés qu'elles ramènent à la surface; mais, font remarquer avec raison MM. Hellriegel et Wilfarth, dans nos expériences, il n'y a pas de sous-sol; il faut donc renoncer à cette explication.

Reste enfin une explication beaucoup plus complexe, et, il semble, plus difficile à ébranler. La voici. La quantité d'azote existant dans le sol résulte d'un équilibre entre les causes qui l'y introduisent et celles qui l'en font disparaître. Dans les premières, on peut citer l'absorption exercée dans l'air, la chute des poussières atmosphériques, la formation de nitrites par l'évaporation de l'eau, les décharges électriques lentes au voisinage du sol, ou encore la transformation de l'azote de l'air en matière albuminoïde sous l'influence des microbes du sol, comme l'a soutenu dans ces derniers temps M. Berthelot. Au nombre des causes qui font disparaître l'azote du sol, il faut citer les pertes de nitrates par les eaux de drainage, et les procès divers de décomposition de la matière azotée qui tous ont pour résultat, comme l'a montré M. Reiset en 1856, de donner un peu d'azote gazeux qui va se perdre dans l'air.

Eh bien! dans cet ensemble compliqué, le rôle qu'on attribue aux légumineuses, et qui a servi à expliquer leurs propriétés fertilisantes, est de diminuer d'une manière générale les causes de perte, par un mécanisme sur lequel on ne dit rien, et qui semble par là devoir échapper à la discussion. Mais MM. Hellriegel et Wilfarth font pourtant observer que le résultat auquel il conduit est dans tous les cas extérieur à la plante; que, dans cette hypothèse complexe, l'enrichissement d'azote se fait dans le sol, et qu'on ne s'explique pas du tout alors pourquoi toutes les plantes d'un même pot n'ont pas le même sort, et pourquoi les unes prospèrent pendant que les autres dépérisSENT.

J'abrége, car le mémoire, si intéressant qu'il soit, est long par endroits, et les répétitions y sont fréquentes. Mais nous voici quand même arrivés aux conclusions suivantes. L'une est que la seule source à laquelle les plantes des cultures de MM. Hellriegel et Wilfarth ont pu emprunter leurs notables excédents d'azote est l'azote libre de l'atmosphère; la seconde est que la cause qui préside à cette absorption de l'azote libre ne résiste pas à la stérilisation du sol, puisque

en sol stérile, le poids d'azote du pied de légumineuse étant toujours, comme dans les céréales, inférieur au poids d'azote de la graine, rien n'indique que la plante puisse ailleurs son azote. Enfin, la troisième conclusion, la plus curieuse, est que, quelle qu'elle soit, cette cause est en dehors de celles que crée l'emploi des mêmes procédés opératoires, puisque dans des vases traités en apparence de la même façon, le sort des graines est si différent. Il fallait donc chercher ailleurs, et c'est ainsi que MM. Hellriegel et Wilfarth ont été conduits à se demander s'il n'y avait pas là une intervention de microbes.

Pour le savoir, ils ont eu l'idée originale de mélanger à leur sol stérilisé 25^{cc}, ou même moins, du liquide trouble qu'on obtient en mettant en suspension de la bonne terre arable dans cinq fois son poids d'eau distillée, et en décantant après 10 heures. La quantité d'azote qu'apportent dans le sol ces 25^{cc} ne dépasse pas 1 milligramme et est tout à fait négligeable, mais l'effet produit n'en est pas moins marqué. Les exceptions et les irrégularités de croissance disparaissent. Tous les pieds de légumineuses, après avoir passé par la période de faim d'azote que nous avons décrite, reprennent avec ensemble, deviennent très beaux et donnent des excédents notables d'azote.

A quoi est due cette mystérieuse influence qui semble donner, à une plante destinée à rester chétive, la faculté de puiser l'azote dans l'air? L'azote apporté par l'eau de lavage de la terre est hors de cause. On peut d'ailleurs n'ajouter que très peu de cette eau sans rien changer au résultat. Puis cette eau ne donne rien avec les céréales, qui n'en continuent pas moins à périr quand on les laisse sans nitrates. De plus, la délayure de terre perd toutes ses propriétés quand elle a été chauffée une ou deux heures à l'ébullition. Il semble même qu'elle puisse les perdre à 70°. Enfin, les délayures des terres de provenances diverses n'agissent pas de même sur toutes les papilionacées. Celle de deux terres à betteraves a vigoureusement poussé la végétation des pois, tandis qu'elle est restée inerte sur le sainfoin et le lupin. Si nous rapprochons de tous ces faits le souvenir des irrégularités que présentent quelquefois dans leur développement deux pieds de légumineuses cultivés côté à côté dans le même pot, nous verrons que tout concorde admirablement avec l'idée d'une action de microbes, présents quand on les ensemence, mais non pas nécessairement absents quand on ne les ensemence pas.

Voici d'autres faits qui parlent dans le même sens que les précédents, et qui vont nous conduire à faire un pas en avant. Dans un sol stérilisé et dépourvu d'azote, les racines des légumineuses restent grêles, chétives, mais elles sont saines. La plante n'assimile pas d'azote. Dans un sol ensemencé avec de la délayure de terre, et dépourvu d'azote, où la plante prend un développement à peu près normal, les

racines sont couvertes de nodosités de taille variable qu'on retrouve, toutes les fois que la plante peut prendre de l'azote à l'air. Par exemple, dans un sol stérilisé, mais pourvu de nitrates, la plante croît sans présenter de nodosités sur ses racines, mais la récolte contient moins d'azote que n'en renfermaient la graine et le sol au début de l'expérience ; il n'y a pas eu d'absorption de l'azote de l'air. Au contraire, dans un sol non stérilisé et pourvu de nitrates, la plante prospère, présente à la récolte un notable excédent d'azote, et ses racines présentent des nodosités.

Nous voici donc conduits à établir une corrélation entre ces trois faits, intervention des microbes, présence des nodosités, et absorption de l'azote atmosphérique. Nous pouvons tout de suite réduire ces faits à deux, en montrant que les nodosités sont produites par des microbes.

D'abord ces nodosités, Brunchorst l'a montré en 1885, renferment une foule de bâtonnets dont on a beaucoup discuté la nature, où les uns ont voulu voir des microbes, les autres des matériaux de réserve de nature albuminoïde et de forme bactéroïde. Il est certain que l'aspect de ces bâtonnets, leur degré de réfringence, la forme arrondie de leurs extrémités, les éloignent un peu des bacilles que nous connaissons le mieux ; de plus, ils sont immobiles ou agités seulement du mouvement brownien. Mais, après les avoir bien examinés, je ne puis que me rallier à l'opinion de ceux qui en font des microbes vivants et capables de se reproduire.

Le meilleur argument pour le prouver serait évidemment d'en faire des cultures pures, mais nous ne savons encore personne qui y ait réussi. M. Bréal¹, qui a fait dans ce sens quelques expériences du reste intéressantes, n'opérait pas avec les précautions suffisantes pour pouvoir affirmer que les microbes des nodosités se développaient seuls. On lui doit pourtant l'expérience originale suivante. Ayant piqué une racine de lupin avec une fine aiguille trempée dans le liquide blanchâtre qui remplit les nodosités d'une racine de luzerne et, ayant enraciné ce plant en sol stérile, à côté d'un autre plant de lupin non piqué et du même degré de développement, il a vu la plante piquée pousser beaucoup plus que sa voisine, et quand on l'a arrachée, ses racines étaient très garnies de nodosités, tandis que l'autre n'en portait pas.

MM. Hellriegel et Wilfarth avaient fait, sous une autre forme, une expérience du même ordre. Dans un lot de pois en germination, on choisit une plantule qui, au lieu d'avoir donné une racine pivotante, a développé deux racines latérales ; on met cette plantule à cheval sur deux vases placés côte à côte et renfermant tous deux une solution

nourricière privée d'azote. Dans l'un on introduit en outre quelques centimètres cubes de délayure de terre, dans l'autre la même quantité de délayure stérilisée par la chaleur. Dans le premier, et dans le premier seul, on voit se développer des nodosités.

Examinées avec la rigueur qu'on est en droit de porter dans l'examen de problèmes aussi délicats, ces deux dernières expériences ne prouvent pas que les nodosités soient l'œuvre des bactéries qu'on y a décrites, mais elles prouvent qu'il y a, soit dans la nodosité piquée dans l'expérience de M. Bréal, soit dans la délayure de terre, une cause animée amenant à la fois la production des nodosités et l'absorption de l'azote atmosphérique. Nous voyons maintenant pourquoi M. Boussingault avait échoué dans la célèbre expérience dans laquelle il avait vu une légumineuse plantée en vase clos, se refuser à prendre de l'azote dans l'air. C'est qu'il avait stérilisé son sol. La preuve, c'est que si on recommence l'expérience, comme l'ont fait MM. Hellriegel et Wilfarth, avec la seule précaution nouvelle de mélanger à ce terrain stérile de culture un peu de délayure de terre, on trouve de tout autres résultats.

L'expérience est trop longue et trop touffue pour que je la rapporte dans tous les détails.

Elle revient, en somme, à faire pousser une plante dans une grande bonbonne de verre hermétiquement close pendant la durée de l'expérience, sauf pendant les intervalles de temps, très courts, nécessaires pour faire passer dans la bonbonne les rations d'acide carbonique nécessaires à la légumineuse en voie de croissance. On réduit ainsi au minimum toutes les sources d'azote, connues ou inconnues, autres que l'air du vase, et quand la plante en absorbe beaucoup, il faut bien admettre qu'elle l'a puisé dans l'air.

Il n'eut sans doute pas été difficile à MM. Hellriegel et Wilfarth d'établir sur ces données une expérience topique comme celle dont nous regrettons l'absence, au début de cet exposé. Celle qu'ils ont faite est devenue compliquée parce que le dispositif expérimental était trop simple. L'évaluation du gain d'azote exige une discussion serrée des causes d'erreur dans lesquelles on peut toujours craindre qu'il ne s'en soit glissé une inconnue jusqu'ici. Mais comme ce gain d'azote s'élève, suivant les cas, à 100, 200 milligrammes et même plus, comme les photographies jointes au mémoire témoignent que la plante prend un développement très grand, on ne peut que se rendre à l'évidence, tout en regrettant qu'un dosage de l'azote total de l'air de la bonbonne au commencement et à la fin, ne soit pas venu fournir une contre-épreuve, peut-être nécessaire pour l'établissement d'une proposition si neuve et si hardie.

Résumons maintenant avec MM. Hellriegel et Wilfarth les conclusions de ce long et intéressant mémoire :

« 1^o Les légumineuses sont foncièrement différentes des graminées quant à leur nutrition azotée.

« 2^o Les graminées ne peuvent s'adresser pour cela qu'aux combinaisons azotées assimilables du sol, et leur développement est toujours en rapport direct avec la réserve d'azote disponible dans le sol.

« 3^o Les légumineuses ont en outre à leur disposition une deuxième source d'azote à laquelle elles peuvent emprunter pour compléter leur provision lorsque la première est insuffisante.

« 4^o Cette seconde source est l'azote libre de l'atmosphère.

« 5^o Les légumineuses n'ont pas par elles-mêmes la faculté de puiser à cette source, elles ont besoin pour cela du concours de micro-organismes vivants présents dans le sol.

« 6^o Tous les organismes inférieurs ne sont pas capables d'amener ce résultat, il faut une association symbiotique de certaines espèces d'entre eux avec certaines espèces de légumineuses.

« 7^o Les nodosités des racines de légumineuses ne sont pas des magasins de matériaux de réserve albuminoïdes, mais sont en relation de cause à effet avec l'assimilation de l'azote libre. »

Là le mémoire s'arrête, et le lecteur en est un peu décontenancé. Quoi ! Pas un mot sur le mécanisme de formation de ces nodosités ; rien sur le mécanisme qui permet à ces microbes de faire de la matière albuminoïde avec l'azote de l'air ! Mais il y a là le germe d'une révolution dans l'économie générale du monde ! S'il y a de pareils êtres, nous avons tout avantage à les connaître, à les cultiver, à élargir leur champ d'action, à les aider dans leur lutte pour l'existence, à leur demander plus que ce qu'ils font en ce moment-ci, et à les employer en grand, pour transformer en matière alimentaire cet azote de l'air, qui constitue la forme moderne du supplice de Tantale. C'est cet azote qui fait la cherté des aliments, qu'arriverait-il si nous pouvions le puiser directement ou indirectement dans l'air ?

L'intérêt n'est pas moins grand au point de vue théorique. Tous les microbes connus sont des destructeurs de matière. Ceux-ci seraient des constructeurs. Comment expliquer cette différence ? Sans vouloir essayer de répondre à cette question, je voudrais la préciser en terminant, car sous cette forme, qui est sa forme vulgaire, elle risque d'être mal comprise. En réalité les microbes sont toujours à la fois constructeurs de matière vivante, et destructeurs de matière organisée. Quand l'*Aspergillus niger* de M. Raulin vit dans une solution de sucre additionnée de sels minéraux, il édifie des cellules nouvelles avec leur constitution complexe, en même temps qu'il détruit le sucre qu'on lui donne pour aliment, et l'un des travaux est la rançon de l'autre. La

matière albuminoïde qu'on trouve dans les tissus de la plante, quand la végétation est terminée, s'est faite aux dépens du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène du sucre, aux dépens de l'azote des sels ammoniacaux qu'on a été obligé d'ajouter au liquide nutritif; mais cette matière albuminoïde n'a pu se créer de toutes pièces que parce qu'une partie plus ou moins considérable du sucre a descendu l'échelle de destruction organique, et a laissé ainsi de la chaleur convertible en travail physiologique.

De même on a le droit de croire jusqu'ici (et cette idée réduit notablement les brillantes perspectives que nous faisions entrevoir tout à l'heure) que les bactéries qui font de la matière albuminoïde avec l'azote de l'air ne peuvent arriver à ce résultat qu'en consommant et détruisant une matière hydro-carbonée déjà formée. C'est ici qu'apparaît la symbiose entre ces bactéries et une plante déjà formée, cette plante grêle qui s'est produite aux dépens des matériaux de la graine. La période d'hésitation, d'incertitude, de chlorose, que nous avons signalée, correspond peut-être à cet établissement de la symbiose, au premier développement sur les racines de ces nodosités qu'on n'observe pas en effet dans la réalité avant ce moment, et dont l'établissement, si notre idée est vraie, doit être accompagné d'une période de souffrance pendant laquelle la plante, fournissant à la vie des microbes avant d'avoir pu profiter de leurs produits, arrive péniblement au moment où les deux espèces symbiotiques profitent également et largement de leur rapprochement. Tous les faits si curieux découverts par MM. Hellriegel et Wilfarth s'expliquent bien dans cette manière de voir. On comprend pourquoi les associations ne se font pas d'une façon quelconque, mais pourquoi chaque espèce de légumineuses a pour ainsi dire ses commensaux. On comprend aussi pourquoi les légumineuses peuvent se comporter autrement que les céréales, ou du moins le fait n'est pas plus inexplicable que l'apparition des Orobanches, par exemple, sur les racines de certaines plantes et pas sur d'autres. Ce sont des questions de nutrition avec lesquelles nous a depuis longtemps familiarisés l'étude des infinitésimales. Il ne resterait plus alors, pour séparer ces microbes des nodosités des légumineuses de tous les autres connus, que leur faculté de s'adresser à l'azote de l'air, et non plus à des nitrates ou à des sels ammoniacaux. Il est vrai que cette différence, si elle est peu importante en théorie, est considérable dans la pratique. Elle renverse toutes les notions que nous croyions avoir sur l'indifférence olympienne de l'azote gazeux, et de ce fait le mémoire de MM. Hellriegel et Wilfarth peut être considéré comme un des plus importants travaux qui aient paru depuis la naissance de la chimie agricole.

STSCHASTNY. Sur les relations entre les bacilles de la tuberculose et les cellules. *Archives de Virchow*, 1889, p. 108.

Le mémoire de M. Stschastny, sans présenter rien de bien original ni de bien nouveau sur l'anatomie pathologique de la tuberculose, mérite cependant d'être lu avec attention.

L'auteur y fait une étude conscientieuse de coupes d'organes tuberculeux du spermophile, du moineau et de la poule. Il ne donne aucun renseignement sur la durée de la maladie des sujets. Sont-ils morts spontanément, ou ont-ils été sacrifiés après un temps déterminé? Il n'est pas inutile de connaître ces détails, car nous savons que le tubercule n'a pas toujours la même structure suivant le moment où on l'examine. Les cellules épithélioïdes et les cellules géantes se forment à des époques déterminées, et pour bien comprendre leur mode de formation, il ne suffit pas de prendre un animal tuberculeux au hasard, mais il faut choisir avec soin ses sujets et les sacrifier à époques déterminées.

Si M. Stschastny avait suivi cette méthode, il aurait pu affirmer plus catégoriquement bien des points qu'il ne fait que présumer, et l'intérêt de son mémoire y aurait gagné.

L'étude de la formation des cellules géantes chez le spermophile, la poule et le moineau est faite avec soin dans le travail qui nous occupe. Nous croyons avec M. Stschastny que le mode de formation des cellules géantes n'est pas toujours le même. Il pense que chez le spermophile elles proviennent d'une cellule-mère dont le noyau se multiplie, tandis que chez la poule elles résultent de la fusion de plusieurs cellules en une seule. Chez le moineau, dit-il, la rapidité de l'infection ne permet pas aux cellules géantes de se former.

L'auteur n'attribue pas aux cellules conjonctives le grand rôle dans la formation du tubercule tel que l'a décrit M. Baumgarten. Ici encore, nous sommes d'accord avec lui. Les cellules qui forment la granulation tuberculeuse sont des cellules migratrices. Ce sont elles qui prennent les bacilles, au lieu que ce soient les bacilles qui pénètrent dans leur intérieur; elles les transportent grâce à la circulation lymphatique et sanguine dans les diverses organes et donnent ainsi lieu à la généralisation de la maladie.

Dans le foie, les cellules hépatiques ne paraissent concourir que très secondairement à la formation du tubercule. L'auteur ne les a jamais vues en voie de division et n'en a pas trouvé qui renfermaient des bacilles.

Enfin M. Stschastny termine en nous disant quelques mots sur la

destruction des bacilles par les cellules géantes. C'est chez le spermophile qu'il a observé ce phénomène, au sujet duquel il est d'accord avec M. Metchnikoff. Mais est-ce là l'unique mode de destruction des bacilles dans l'organisme? Nous ne le croyons pas quoique l'auteur semble avoir cette opinion. Dans les tubercules caséux, les bacilles naissent et meurent en des points où l'on n'observe plus aucun élément cellulaire. Les leucocytes, eux-mêmes, sans être agglutinés en cellules géantes, contiennent souvent dans les tuberculés du cobaye des bacilles granuleux et ne se colorant plus bien.

Dr YERSIN.

Rapport sur les expériences faites pour démontrer l'efficacité de la vaccination charbonneuse de M. Pasteur contre le *Cumberland disease*. Assemblée législative de la Nouvelle-Galles du Sud, Sydney, 1888.

De l'identité constatée par MM. Loir, Germond et Hinds (voir ces *Annales*, t. II, p. 511), entre le *Cumberland disease* d'Australie et le charbon, on pouvait conclure à l'efficacité de la vaccination charbonnene contre cette maladie. C'est cette efficacité que MM. Loir et Germond viennent de démontrer par une expérience publique, faite sur le même programme que celle de Pouilly-le-Fort, et dans laquelle 20 moutons et 4 vaches vaccinées ont résisté à l'inoculation d'un sang charbonneux, qui a tué 19 moutons non vaccinés, sur 19 qui l'avaient reçu, et, sur deux vaches non vaccinées, en a tué une, et a rendu l'autre très malade.

INSTITUT PASTEUR

Personnes traitées ayant succombé à la rage.

DRUAUX (Blanche), 15 ans, d'Aubervilliers (Seine). Mordue le 7 janvier 1889 à la joue gauche, à 3 centimètres au-dessous de l'œil. Les dents ont fait deux plaies longues de 8 millimètres, et ayant un peu saigné. Autour la joue est meurtrie. Les morsures ont été lavées à l'arnica 5 minutes après qu'elles ont été faites. L'animal mordeur est un chien qui a été abattu par M. Coret, vétérinaire à Aubervilliers, qui l'a déclaré enragé.

Traitée du 9 au 28 janvier, Druaux devient malade le 6 février, elle se plaint de maux de tête, elle est conduite le 7 à l'hôpital Lariboisière. Les symptômes de la rage convulsive confirmée se montrent le 9 février; elle meurt le 11 février. La rage s'est déclarée 9 jours après le traitement.

DUFOUR (Jean-Louis), 72 ans, de Veyras (Ardèche). Mordu le 23 décembre 1888 : 1^o à la main droite qui porte onze blessures sur la face dorsale, cinq sont profondes; 2^o une morsure sur la face dorsale du médius; 3^o une morsure sur la face dorsale du petit doigt; 4^o cinq morsures sur la face dorsale du poignet droit, elles ont été faites à nu; 5^o à la face postérieure de l'avant-bras, dans la portion médiane, cinq morsures, la manche de la veste a été traversée.

Toutes ces blessures, au nombre de vingt-trois, ont donné du sang, et ont traversé toute l'épaisseur de la peau. Plusieurs sont plus profondes. La main est très gonflée. Ces plaies ont été lavées à l'eau sédatrice, elles ne présentent pas de traces de cauterisation. Dufour a été traité du 23 décembre 1888 au 12 janvier 1889.

Le docteur Merlet, de Privas, donne sur Dufour les renseignements suivants :

« Depuis l'époque de ses blessures, et durant tout le temps du traitement qu'il a subi à l'Institut Pasteur, cet homme était hanté constamment par des cauchemars et des hallucinations. Le 9 février, apparurent soudain, après le repas, des spasmes œsophagiens, accompagnés d'hydrophobie. En même temps, il présentait quelques phénomènes douloureux au niveau de son avant-bras mordu. Appelé à le voir, je diagnostiquai la rage. Dans la nuit du 12 au 13 sont survenus des symptômes violents, du délire, des accès de fureur; le malade a cherché à mordre son entourage, et se déchirait le bras malade avec ses ongles. Il avait de l'hypéresthésie sensorielle, craignait la lumière, et saisissait le moindre bruit, etc. Il meurt, le 13 février, à 1 heure du soir. »

La tête du chien mordeur a été envoyée à l'Institut Pasteur, le 31 décembre. Les animaux inoculés avec le bulbe étaient enragés le 19 janvier 1889.

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE¹ DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE. — JANVIER 1889.

	A	B	C
Morsures à la tête { simples	2	2	2
et à la figure { multiples.....	5	5	2
Cautérisations efficaces	»	»	1
— inefficaces	3	2	0
Pas de cautérisation.....	4	3	4
Morsures aux mains { simples.....	8	31	2
multiple.....	7	59	11
Cautérisations efficaces	3	4	1
— inefficaces	3	21	3
Pas de cautérisation.....	9	37	7
Morsures aux mem- { simples.....	4	6	3
bres et au tronc { multiples.....	4	14	6
Cautérisations efficaces	2	20	9
— inefficaces	4	6	2
Pas de cautérisation.....	2	14	6
Habits déchirés.....	7	19	8
Morsures à nu.....	4	4	4
Morsures multiples en divers points du corps	2	2	0
Cautérisations efficaces	»	»	0
— inefficaces	4	1	0
Pas de cautérisation.....	4	1	0
Habits déchirés	1	1	0
Morsures à nu.....	4	1	0
Totaux. { Français et Algériens	21	82	21
Etrangers	11	6	1
	A	B	C
TOTAL GÉNÉRAL.....		142	

1. La colonne A comprend les personnes mordues par des animaux dont la rage est reconnue expérimentalement; La colonne B celles mordues par des animaux reconnus enragés à l'examen vétérinaire; La colonne C les personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Les animaux mordeurs ont été :

Chiens, 133 fois; chats, 6 fois; bœuf, 1 fois.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et fils.